

# **„Mechanismus Hypoxie-induzierter Permeabilitätsveränderungen am *in vitro* Modell der Bluthirnschranke“**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von      Maria Anne Wobben  
aus                      Thuine

Giessen

2002

# **„Mechanismus Hypoxie-induzierter Permeabilitätsveränderungen am *in vitro* Modell der Bluthirnschranke“**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von	Maria Anne Wobben
aus	Thuine

Giessen

2002

Aus dem Max-Planck-Institut  
für Physiologische und Klinische Forschung  
Kerkhoff-Institut  
Abteilung Experimentelle Kardiologie  
Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Schaper  
In Bad Nauheim

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Schaper  
Gutachter: PD Dr. T. Noll

Tag der Disputation: 17.Juli 2003

**für Anne**



# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Historischer Hintergrund	1
1.2. Zellen der Bluthirnschranke	2
1.3. Spezielle Eigenschaften des cerebralen Endothels	2
1.3.1. Tight Junction oder Zonula occludens	4
1.3.2. Gap Junctions (GJ)	6
1.3.3. Adherens Junction (AJ)	6
1.3.4. Desmosomen (Macula Adherens)	5
1.4. Mediatoren vaskulärer Permeabilität	5
1.5. Enzyme und Transporter der Bluthirnschranke	8
1.6. Permeabilitätskontrolle der BHS	9
1.6.1. Modelle der Bluthirnschranke: Nachteile und Vorteile	9
1.6.2. Einsatz des in vitro BHS – Modells für Permeabilitätsstudien	10
1.7. Einfluß von Astrozyten auf Eigenschaften der Bluthirnschranke	11
1.8. Pathologische Prozesse an der Bluthirnschranke	13
1.9. Rolle des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) unter pathologischen Bedingungen	13
1.10. Zielsetzung der Arbeit	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1. Arbeiten in der Zellkultur	17
2.1.1. Kultivierung eukaryontischer Zellen	17
2.1.2. Passagieren der Zellen	18
2.1.3. Einfrieren, Lagerung und Auftauen der Zellen	18
2.1.4. Herstellung von konditioniertem Medium	18
2.2. Verwendete Zelltypen	19
2.2.1. Isolierung von BMEC	19
2.2.2. Isolierung von Astrozyten	21

	<b>Seite</b>
2.2.3. Isolierung von BSMC	22
2.2.4. Zelllinien	23
2.2.5. Kokulturen	24
2.3. Charakterisierung der verwendeten Zelltypen	24
2.3.1. Charakterisierung von Endothelzellen	24
2.3.2. Charakterisierung von Astrozyten	26
2.3.3. Charakterisierung von glatten Muskelzellen	27
2.4. Permeabilitätsversuche	27
2.4.1. Verwendete Marker: EBA (Evans blue albumin) und [ $^3\text{H}$ ] Inulin	27
2.4.2. Messung der Permeabilität	28
2.5. In vitro Hypoxiemodell	29
2.6. Zytotoxizitätstest	29
2.7. Immunhistochemie	30
2.7.1. Vorbereitung des Probenmaterials für die Immunfluoreszenz	30
2.7.2. Durchführung der Immunhistochemie	30
2.8. F-Aktin-Assay	33
2.9. Arbeiten mit Proteinen	33
2.9.1. Protein-Isolierung für den Western Blot	33
2.9.2. Western Blot	36
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1. Charakterisierung der verwendeten primären Zellkulturen	41
3.2. Wirkung von Hypoxie auf Permeabilitätseigenschaften des BMEC-Monolayers	48
3.3. Wirkung von Hypoxie auf die Expression des Zonula-occludens-Protein-1 (ZO-1)	54
3.4. Wirkung von Hypoxie auf die F-Aktin-Expression	58
3.5. Rolle des VEGF bei der hypoxiebedingten veränderten ZO-1 Expression	62

	<b>Seite</b>
3.6. Wirkung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) auf die ZO-1 Expression	66
3.7. Proteinexpression und Phosphorylierung des ZO-1	67
3.8. Einfluß von Gliazellen auf hypoxieinduzierte Permeabilitätsveränderungen	69
3.9. Einfluß von Gliazellen auf die Permeabilität des BMEC-Monolayers unter normoxischen Bedingungen	72
3.10. Einfluß von Gliazellen auf hypoxiebedingte Permeabilitätsveränderungen des Endothelzell-Monolayers	74
3.11. Wirkung von C6-konditioniertem Medium auf die Expression des ZO-1	76
3.12. Statistik	76
<b>4. Diskussion</b>	<b>77</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>6. Ausblick</b>	<b>89</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>103</b>
8.1. Liste der verwendeten Abkürzungen	103
8.2. Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	105
<b>9. Danksagung</b>	<b>107</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>109</b>



# 1. Einleitung

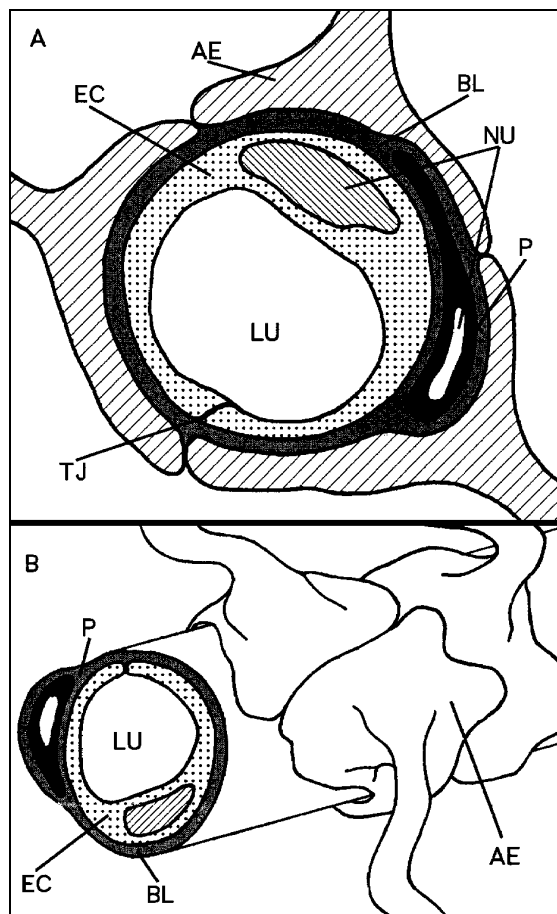
## 1.1. Historischer Hintergrund

Zu Beginn dieses Jahrhunderts machte Paul Ehrlich die Entdeckung, daß intravenös injizierte Farbstoffe nur schwerlich Zugang zum Gehirn fanden, wohingegen sie in alle anderen Gewebe nahezu problemlos und schnell penetrierten.

Dies brachte ihm die Erkenntnis, daß Mechanismen existieren müßten, die in der Lage wären den ungehinderten Zutritt von bestimmten Stoffen zum Gehirn zu unterbinden.

So entwickelte sich im Laufe der Zeit die Vorstellung einer Barriere zwischen Gehirn und dem übrigen Organismus.

Heute hat die Vorstellung einer aus zerebralen mikrovaskulären Hirnendothelzellen bestehenden Blut – Hirn – Schranke allgemein Akzeptanz gefunden.



*Abb. 1 Schema der Bluthirnschranke am Beispiel einer Blutkapillare*

*Querschnitt durch eine Kapillare, Endothelzellen bilden die Auskleidung des Gefäßes mit Tight Junctions (TJ) an den Berührungspunkten der Zellen. Die Wand des Gefäßes ist eng mit Perizyten und Astrozyten assoziiert, wobei die Astrozyten durch eine Basallamina von den Endothelzellen getrennt sind.*

*Aufsicht auf eine Blutkapillare Astrozyten umgeben die Kapillare vollständig mit ihren Endfüßchen*

*AE-Astrozytenendfüßchen*

*BL-Basallamina*

*EC-Endothelzelle*

*LU-Lumen der Kapillare*

*P-Perizyt*

*N-Nucleus*

*Quelle: Goldstein <sup>1</sup>*

## **1.2. Zellen der Bluthirnschranke**

Zu den an der Bluthirnschranke beteiligten Zellen gehören zum einen Endothelzellen, die die Kapillaren des Gehirns im Inneren auskleiden. Durch eine Basallamina sind diese von den Bindegewebszellen (Gliazellen, Astrozyten und Mikroglia) und deren Fortsätzen getrennt. In die Basallamina eingebettet sind Perizyten, die kontraktile Elemente der Kapillaren darstellen und in ihrer Funktion mit der glatter Muskelzellen in den großen Blutgefäßen des Organismus vergleichbar sind. Es besteht ein enger Kontakt zwischen Perizyten und Endothelzellen, der sich jedoch auf kleine Bereiche zwischen den Fortsätzen der Perizyten und den Endothelzellen beschränkt. Die zentrale Funktion der Perizyten liegt in der Regulierung des Blutflusses und der Kontrolle endothelialer Proliferation durch eine Wachstumshemmung der Endothelzellen mediiert durch TGF- $\beta$  <sup>2</sup>. Außerdem erfolgt eine Beteiligung der Perizyten an der Schrankenfunktion vermutlich über deren phagozytotische Eigenschaften. Mikroglia finden sich hauptsächlich in der perivaskulären Region, sie spielen eine Rolle in der Immunpathologie verschiedener ZNS-Erkrankungen. Auf Astrozyten und BMEC soll im folgenden noch näher eingegangen werden.

## **1.3. Spezielle Eigenschaften des zerebralen Endothels**

Um ihrer Funktion als Bluthirnschranke nachzukommen, weisen zerebrale Endothelzellen gewisse Eigenschaften auf, die sie von peripheren Endothelzellen unterscheiden.

Der passive Transport von Substanzen in das Gehirn steht in engem Zusammenhang mit den strukturellen Eigenschaften des zerebralen Endothels, der Lipophilität, der Molekülmasse und Ladung der zu transportierenden Substanz.

Die nicht pathologisch veränderte Bluthirnschranke verhindert die Passage von ionisierten wasserlöslichen Molekülen mit mehr als 180 kDa. (Zum Vergleich: Chemotherapeutika haben eine Größe von 200 - 1200 kDa.)

Die oben beschriebenen Voraussetzungen zur Penetration der Bluthirnschranke finden ihr Korrelat in der Darstellung des Octanol-Wasser-Koeffizienten (Abb. 2).

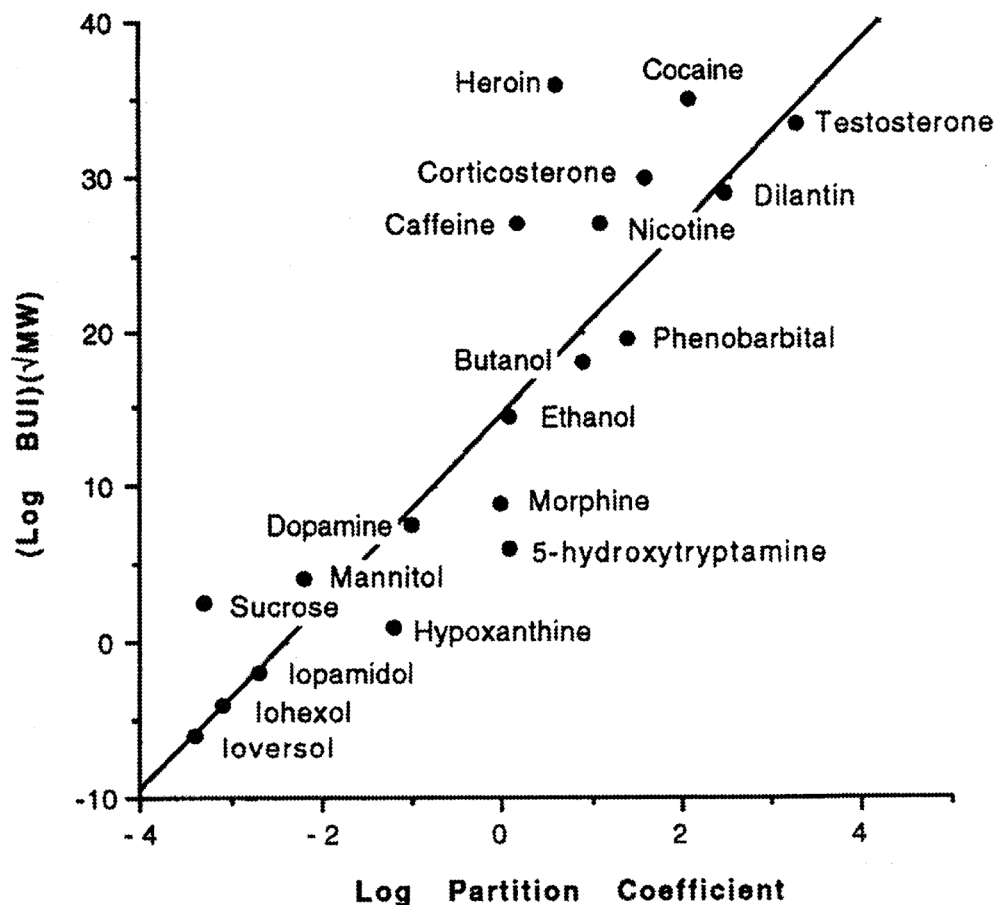


Abb. 2 Der Octanol-Wasser-Koeffizient zeigt die Relation zwischen BUI (Brain uptake index) und Molekulargewicht (MW). Quelle: Sage <sup>3</sup>

Weiterhin ist die pinocytotische Aktivität der Endothelzellen gegenüber derjenigen von Endothelzellen anderer Organe stark herabgesetzt, was den transzellulären Flux stark reduziert. Die transzelluläre Passage erfolgt über unterschiedliche Endozytosemechanismen. Man unterscheidet hierbei „fluid phase“, rezeptorvermittelte Endozytose, etc. Hierbei sind mit Clathrin bedeckte Vesikel wirksame Hilfsmittel zur Aufnahme spezifischer Makromoleküle aus der extrazellulären Flüssigkeit. Die Makromoleküle binden an komplementäre Zelloberflächen-Rezeptoren, sammeln sich in den Coated-Pits an und gelangen, in Form von Rezeptor-Makromolekül-Komplexen, in den Endocytose-Vesikeln in die Zelle. Wenn sich die Coated Pits einstülpen und Coated Vesicles bilden, dann wird auch extrazelluläre Flüssigkeit mit eingeschlossen. Die in ihr gelösten Stoffe werden also ebenfalls aufgenommen, allerdings in viel geringerem Ausmaß; den betreffenden Vorgang nennt man Flüssigphase-Endozytose (fluid phase). Durch die Rezeptorvermittelte Endozytose werden bestimmte Makromoleküle selektiv angereichert. Auf diese Weise können selbst schwach konzentrierte Bestandteile der extrazellulären Flüssigkeit spezifisch in großer Menge aufgenommen werden, ohne daß eine entsprechend große Flüssigkeitsmenge in die Zelle gelangen muß <sup>4</sup>.

Negative Ladungen an der luminalen Oberfläche des Endotheliums werden ebenfalls mit der Schrankenfunktion in Verbindung gebracht. Polykationen binden an diese negativen Ladungen und induzieren so vermutlich endozytotische Prozesse<sup>5</sup>. Es findet sich zudem keine Fenestrierung des Endothels wie sie in peripheren Geweben zu finden ist. In diesen Geweben erleichtert die Fenestrierung den Austausch von Substanzen zwischen Blut und Gewebe. Zu den Organen in denen dieser Austausch stattfindet zählen endokrine Drüsen, renale Glomeruli, intestinale Villi und der Plexus choroideus. Außerdem kommen fenestrierte Kapillaren in den circumventrikulären Organen des Gehirns vor. Dazu gehören die Area postrema, der Thalamus, die Zirbeldrüse, etc.. Kennzeichnend für diese Gewebe ist eine hohe Vaskularisierung. Durch die hier vorhandene Fenestrierung der Kapillaren und somit Durchlässigkeit der Blutliquorschranke werden diese Anteile des Gehirns mit der Funktion der neuronalen Regulation des Kreislaufs in Verbindung gebracht, so daß beispielsweise die Konzentrationen verschiedener Elektrolyte wie  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  und  $H^+$  kontrolliert werden, um eine Abhängigkeit des Gehirns von den allgemeinen Schwankungen im Elektrolythaushalt auszuschließen.

Eine bedeutende Rolle bei der niedrigen Permeabilität des Gehirndothels spielt die Ausbildung spezieller interzellulärer Verbindungen. Hierbei handelt es sich um komplexe Strukturen, die vornehmlich durch transmembranäre adhäsive Moleküle gebildet werden und sich zu einem Gerüst aus zytoplasmatischen und zytoskeletalen Proteinen zusammenfügen. Man unterscheidet vier verschiedene Arten von endothelialen Verbindungen. Tight Junctions (TJ), Gap Junctions (GJ), Adherens Junctions (AJ) und Desmosomen.

### **1.3.1. Tight Junction oder Zonula occludens**

Das Endothel der Kapillaren des Gehirns unterscheidet sich entscheidend von Endothelien peripherer Organe durch die Anwesenheit von festen interzellulären Verbindungen, sogenannten Tight Junctions (TJ). Hierbei handelt es sich um komplexe, an der Membran lokalisierte Proteinstrukturen zwischen den Zellen, die durch unterschiedliche Einzelproteine zusammengesetzt sind. Bei den sogenannten Tight Junctions handelt es sich um komplexe Strukturen, die interzellulär die Undurchlässigkeit des Endothelzellmonolayers und somit der Blut- Hirn-Schranke gewährleisten sollen. In der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie stellt sich die TJ als Netzwerk linearer Fibrillen dar, welche die Zelle umgeben und durch kurze transversale Fibrillen unterteilt sind<sup>6</sup>. TJ bilden keine kontinuierliche Begrenzung rund um die Zelle. Die Anzahl von TJs variiert je nach Bedarf an Permeabilitätskontrolle. Das Endothel der großen Arterien (Aorta, etc.) hat eine



hohe Dichte an TJs, während beispielsweise in postkapillären Venolen TJs gar nicht vorzukommen scheinen und 30% der Bindungen offen sind <sup>7</sup>.

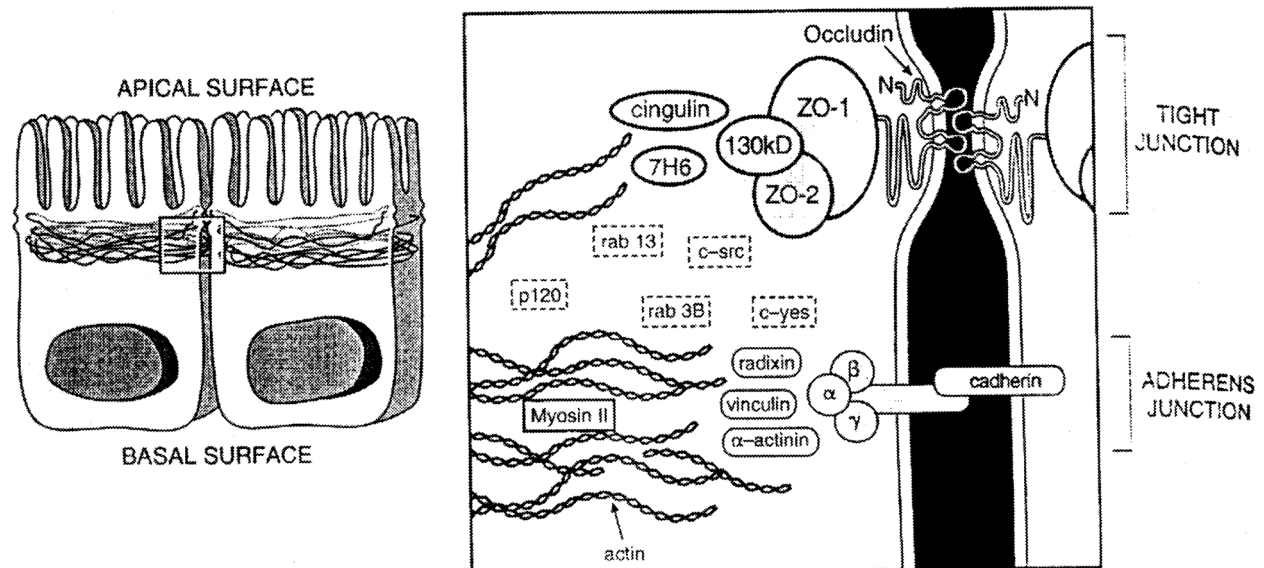


Abb. 3 Übersicht der Position von Tight Junctions an der apikal-lateralen Membran zwischen Endothel- oder Epithelzellen (links), hypothetisches Modell von Proteininteraktionen an Tight Junctions (rechts). Quelle: Anderson <sup>8</sup>

Unter anderem gehört Zonula occludens protein 1 (ZO-1) zur Gruppe der Proteine aus der sich die Tight Junction zusammensetzt. ZO-1 ist an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert, und hierbei eng mit einem weiteren Protein-ZO-2, assoziiert. ZO-1 besitzt eine  $\alpha$ - und eine  $\alpha+$ -Isoform. Die  $\alpha$ -Isoform wird von vaskulären Endothelien exprimiert und durch alternative Splicingvorgänge der RNA verursacht <sup>9</sup>. Watson begründete die funktionelle Bedeutung des ZO-1 mit seiner Präsenz in der Bluthirnschranke <sup>10</sup>. Krause et al. <sup>11</sup> konnten in ihren Untersuchungen eine gesteigerte Expression des ZO-1 in Verbindung mit einem gesteigerten transepithelialen Widerstand in Hirnendothelien der Ratte nachweisen. Gardner et al. zeigten eine Hochregulation der Expression des ZO-1 im Beisein von Astrozyten-konditioniertem Medium in kultivierten retinalen kapillären Endothelzellen <sup>12</sup>. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die ZO-1 Expression durch physiologische Einflüsse regulierbar zu sein scheint, und sich auch ein Anteil an der Regulation der parazellulären Permeabilität abzeichnet.

Lum et al. wiesen 1994 eine Verbindung zwischen ZO-1 und F-Aktin, einem wesentlichen Bestandteil des Zytoskeletts der endothelialen Zelle nach, und implizierten dort eine funktionelle Verbindung zwischen Zytoskelett und Tight Junction <sup>13</sup>. Eine funktionelle Verbindung des ZO-1 mit der Cadherin-basierenden Zelladhäsion beschrieben Itoh et al. 1997, bei der eine direkte Bindung des ZO-1 an

$\alpha$ -Catenin und Aktin-Filamente zugrunde liegt<sup>14</sup>. Untersuchungen von Esser et al. belegen, daß ZO-1 ebenfalls eine Rolle bei der Regulation von VEGF modulierter Zell-Zell-Adhäsion spielen könnte<sup>15</sup>. Wichtige Komponenten der Adhäsionsbindungen der endothelialen Zelle stellen VE-Cadherin, p120 und  $\beta$ -Catenin dar. VE-Cadherin (Vascular endothelial cadherin) ist im wesentlichen an der Regulation der Permeabilität der Endothelzellen, sowie deren Migration und an der Bildung neuer Blutgefäße beteiligt<sup>16-18</sup>. Es wird somit deutlich, daß ZO-1 ein Protein ist, welches in das komplexe Zusammenspiel zytoskeotaler und adhäsiver Elemente der Zelle eingebunden ist und über diese Mechanismen Einfluß auf die Regulation der Permeabilität und Migration der Zellen ausübt. Die „Festigkeit“ der TJs im Zellmonolayer spiegelt sich in der Ausbildung eines meßbaren elektrischen Widerstands wieder, der zur Dokumentation dieser interzellularen Verbindungen benutzt werden kann. Crone und Olesen maßen bei *in vivo* - Versuchen an Endothelzellen aus Froschhirn Werte von  $1800 \Omega\text{cm}^2$ <sup>19</sup>, wohingegen bei *in vitro* - Messungen an mikrovaskulären Hirnendothelzellen elektrische Widerstände von  $60\text{-}300 \Omega\text{cm}^2$  erreicht werden<sup>20-23</sup>.

### 1.3.2. Gap Junctions (GJ)

Diese bemerkenswerte Zellverbindung ist eine der häufigsten Zellverbindungen: Man findet GJs in großer Zahl in vielen Geweben. Bei GJs handelt es sich um Häufungen von transmembranären hydrophilen Kanälen, die einen direkten Austausch von Ionen und kleinen Molekülen zwischen zwei angrenzenden Zellen ermöglichen.

Diese Kanäle werden vorwiegend von Connexinen gebildet. In endothelialen Zellen wurden bereits mehrere verschiedene Connexine beschrieben (z. B. Co43, Co40, Co37), die in unterschiedlichen Gefäßen exprimiert werden.

GJs besitzen wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung homotyper (Endothelzellen untereinander) und heterotyper (Endothelzellen – glatte Muskelzellen, Endothelzellen – Makrophagen) Kommunikation. Auf diese Weise verbinden sie die Zellen sowohl elektrisch als auch metabolisch.

Die Dichte der GJs korreliert mit der von TJs.

### 1.3.3. Adherens Junction (AJ)

Bei diesen Verbindungen handelt es sich sowohl um interzelluläre Anheftungspunkte wie auch um Anheftungsstellen der Zellen an das sie umgebende Substrat

(Matrix). Diese Zellverbindungen finden sich in nahezu allen Zellgeweben. Eine der wichtigsten Proteine dieser Membranstruktur stellt die Gruppe der Cadherine dar, die die Zell-Zell-Adhäsion über calciumabhängige Mechanismen steuern<sup>24</sup>. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Glykoproteine, die in ihrer Struktur in die Plasmamembran integriert sind. Das Endothel der Bluthirnschranke exprimiert nur zwei verschiedene Cadherine: N-Cadherin (neural Cadherin) und VE-Cadherin (vascular endothelial Cadherin).

#### **1.3.4. Desmosomen (Macula Adherens)**

Desmosomen sind knopfartige Zell-Zell-Kontaktpunkte; sie wirken wie Nieten, die in verschiedenen Geweben die Zellen zusammenhalten. Außerdem dienen sie als Verankerungspunkte für Intermediärfilamente, die im Zytoplasma ein Strukturgerüst bilden und ihm Zugfestigkeit verleihen. Die Intermediärfilamente bestehen je nach Zelltyp aus unterschiedlichen Strukturproteinen; hierzu gehören Desmin, Keratin und Vimentin.

### **1.4. Mediatoren vaskulärer Permeabilität**

Wie bereits angesprochen, unterliegen die Vorgänge am Endothel gewissen Regulationsmechanismen. Faktoren, die diese mit zu beeinflussen vermögen, sind Histamin, Atrial Natriuretic Factor (ANF) und Adenosin. Diese Mediatoren sind in der Lage die vaskuläre Permeabilität zu steigern oder zu senken, wobei sie sich zeitweise desselben second-messenger-Weges bedienen. Viele Substanzen - auch Thrombin und Histamin – induzieren rasche jedoch kurzlebige (auf Minuten begrenzte) Anstiege in der vaskulären Permeabilität – Zytokine und Hypoxie erst nach Stunden oder Tagen. Viele Studien beschäftigten sich bereits mit der Frage welche Substanzen an der Erhöhung endothelialer Permeabilität beteiligt sind und welche Auswirkungen sie haben. Thrombin erhöht die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und stimuliert die Proteinkinase C. Hypoxie senkt zyklisches Adenosinmonophosphat *in vitro*. Obwohl einige second-messenger-Wege beschrieben worden sind, ist jedoch noch wenig über die molekularen Zielstrukturen bekannt. Häufig wurden bereits eine Reorganisation von Aktinfilamenten gekoppelt mit Zellretraktion im Zusammenhang mit permeabilitätssteigernden Substanzen gefunden. Caveda et al. fanden, daß bei Stabilisierung des Aktingerüsts eine Senkung endothelialer Permeabilität resultierte. Wurden die Aktinfilamente jedoch gehemmt, stieg die Permeabilität an<sup>25</sup>. Offensichtlich scheinen Entzündungsmediatoren durch die Bindung an

spezifische Rezeptoren in der Lage zu sein intrazelluläre Signale zu induzieren und über diese zytoskeletale Reorganisation und Öffnung von interendothelialen Zellverbindungen hervorzurufen. Dies äußert sich in einem Permeabilitätsanstieg. Weiter kontrollieren endotheliale Bindungen die Leukozyten–Extravasation. Leukozyten binden bei diesem Vorgang an das Endothel, woraufhin sich ein koordinierter Öffnungsprozeß interendothelialer Bindungen vollzieht.

### **1.5. Enzyme und Transporter der Bluthirnschranke**

Eine weitere Besonderheit der Bluthirnschranke liegt in ihrer Dynamik. Es handelt sich hierbei nicht um eine passive Lipidmembran, sondern um ein ausgeklügeltes System, das luminal und abluminal eine Vielzahl von metabolischen Enzymen und Transportern besitzt, die in peripheren Endothelien nicht oder nicht in dieser Form vorhanden sind. Somit handelt es sich bei der Bluthirnschranke nicht nur um eine rein physikalische sondern auch um eine metabolische Barriere, die in dieser Form die Homöostase des Gehirns gewährleistet<sup>26</sup>. Wichtige Enzyme des zerebralen Endothels sind die Alkalische Phosphatase,  $\gamma$ -Glutamyltransferase, Dopa-Decarboxylase, Monoaminoxidasen (MAO), Aminopeptidasen, Nucleotidasen, etc..

Obwohl Glucose, große Aminosäuren und andere hydrophile Stoffe nicht in der Lage sind passiv die Bluthirnschranke zu überwinden, bleibt die nutritive Versorgung des Gehirns durch spezielle luminale und abluminale Transportsysteme gewährleistet<sup>27</sup>. Hierzu zählt auch ein spezielles Transportsystem für Monocarboxylsäuren<sup>26</sup>, welches in Zeiten der Mangelversorgung des Gehirns hochreguliert wird und so die Nutrition des Gehirns in Form von Ketonkörpern als metabolisches Substrat zu überbrücken sucht. Desweiteren existieren Systeme zur Ausfuhr von Stoffen aus dem Gehirn. So exprimieren BMEC z. B. den P-Glykoprotein-Transporter, der mit der Ausfuhr von Medikamenten wie Cyclosporin A und Vincristin aus dem ZNS in Verbindung gebracht wird<sup>28</sup>. Eine energieabhängige Pumpe an der abluminalen Membran der BMEC gewährleistet eine niedrige Konzentration von kleinmolekularen Aminosäuren in der Extrazellulärflüssigkeit des Gehirns<sup>27</sup>.

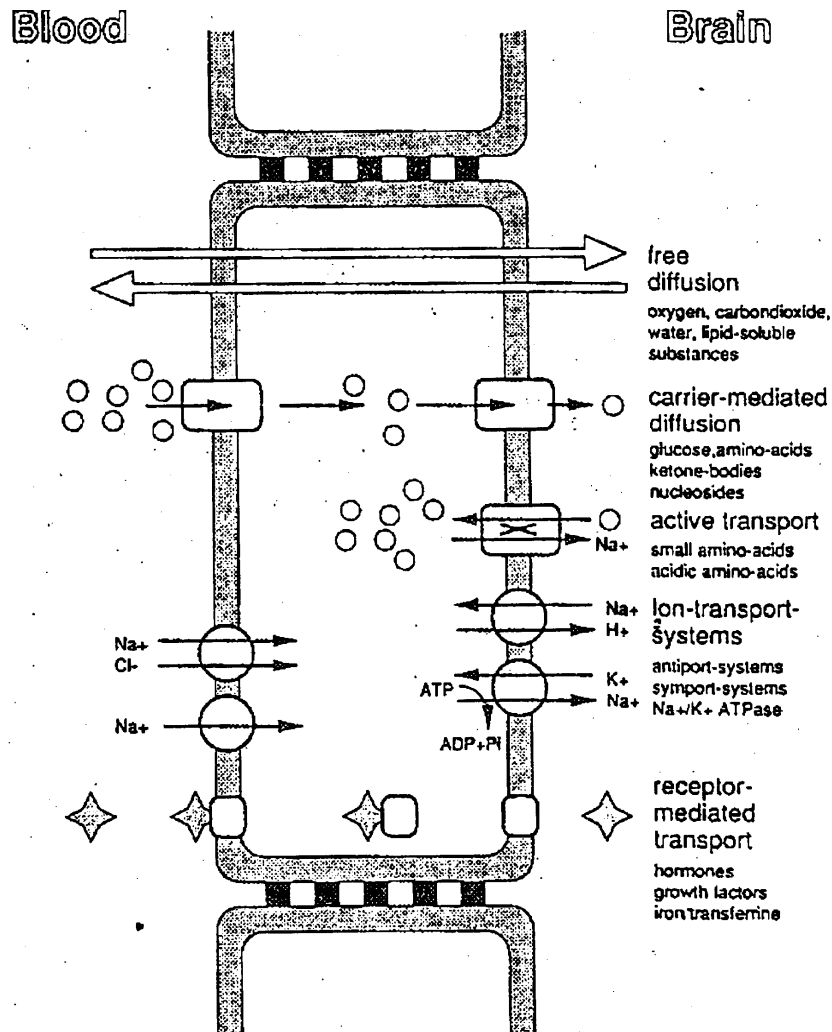


Abb. 4 Schema der verschiedenen Transportmechanismen am Endothel zerebraler Kapillaren. Quelle: Zinke<sup>29</sup>

## 1.6. Permeabilitätskontrolle der BHS

### 1.6.1. Modelle der Bluthirnschranke: Vorteile und Nachteile

Um die Eigenschaften der Bluthirnschranke weiter erforschen zu können, bediente man sich sogenannter „*in vitro*“ – Modelle, die die Eigenschaften der Bluthirnschranke *in vivo* simulieren sollten. Verschiedene Methoden zur Isolierung von Endothelzellen aus Hirnkapillaren wurden beschrieben<sup>30-32</sup>. Alle Isolierungsformen beinhalten enzymatische oder mechanische Auftrennungsverfahren, oder eine Kombination der beiden Techniken gefolgt von Filtrations- oder Zentrifugationschritten. Diese Auftrennungsverfahren ermöglichen die Isolierung einer homogenen Population von Endothelzellen aus der heterogenen Population aller Hirnzellen. Die Vorteile der Schaffung eines solchen Modells der Bluthirnschranke liegen insbesondere in der auf relativ wenige Arbeitsschritte begrenzten Isolierung

und der guten Handhabung der Zellen. Es hat sich gezeigt, daß sich die Primärkulturen mikrovaskulärer Hirnendothelzellen bezüglich ihrer Enzymexpression bei Kokultivierung mit Astrozyten nicht von Zellen in ihrer natürlichen Umgebung unterscheiden. Außerdem besitzen sie dieselben spezifischen Enzyme wie  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase und Alkalische Phosphatase. Desweiteren besitzen sie Endothelzellmarker wie Angiotensin-Converting-Enzyme und Faktor-VIII-Antigen, Katecholamin-degradierende Enzyme (Monoaminoxidase A+B, zytosolische Katechol-O-Methyltransferase, und thermostabile Phenol-Sulfotransferase<sup>33-35</sup>). Weitere Enzyme, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, finden sich ebenfalls *in vitro*, so daß sich alle biochemischen Bestandteile, die bislang mit der Bluthirnschranke *in vivo* in Verbindung gebracht werden, auch *in vitro* wiederfinden. Schwierigkeiten bei der Verwendung von isolierten Endothelzellen ergeben sich zum einen dadurch, daß die Zellpopulationen oft nicht absolut rein sind und noch andere Zelltypen wie Perizyten enthalten sind<sup>36,37</sup>, zum anderen durch metabolische Defizite, die sich durch die Prozedur der Isolierung ergeben<sup>38</sup> und die zu Problemen bei der Untersuchung von Zelltransportwegen führen können. Beispielsweise ist die ATP-abhängige rezeptorgesteuerte Exozytose bei isolierten Hirnendothelkapillaren nicht mehr nachweisbar<sup>39</sup>. Dies scheint durch eine Schädigung der Endothelzellen infolge von mechanischer oder enzymatischer Homogenisierung während der Isolierung ausgelöst zu werden. Hingegen bleibt die rezeptorgesteuerte Endozytose in isolierten Hirnkapillaren als energieunabhängiger Prozeß nachweisbar<sup>39</sup>. Die isolierten Hirnzellen zeigen häufig auch eine verminderte Ausprägung von Eigenschaften, welche *in vivo* durch benachbarte Gliazellen, etc. induziert werden. Dieses Manko versucht man mit Hilfe von Kokulturmodellen beispielsweise mit Astrozyten zu beheben.

### 1.6.2. Einsatz des *in vitro* BHS-Modells für Permeabilitätsstudien

Grundsätzlich haben sich zwei experimentelle *in vitro* Modelle zur Darstellung von Permeabilitätsvorgängen an der Bluthirnschranke durchgesetzt. Diese Modelle basieren auf der Verwendung von kollagen-beschichteten Membranen mit Mikroporen, auf denen die Endothelzellen kultiviert werden. Hierbei unterscheidet man ein side-by-side-Diffusionssystem und ein Transwellsystem (s. Abb. 5).

Beim Side-by-side-Diffusionsmodell bietet sich die Möglichkeit sowohl abluminale als auch luminale transendotheliale Transportprozesse zu verfolgen. Außerdem fehlt bei diesem System eine stationäre Phase. Obgleich die Endothelzellmonolayer *in vitro* TJs enthalten, sind diese in ihrer Ausprägung jedoch nicht mit denen *in vivo* bezüglich Komplexität, etc. vergleichbar. Dies führt zu einer größeren Durchlässigkeit *in vitro* verglichen mit dem *in vivo*-System. So betrugen die

Widerstandswerte *in vivo* gemessen an Froschhirnendothelzellen  $1800 \Omega\text{cm}^2$ <sup>19</sup>, *in vitro* werden Widerstandswerte bis zu  $300 \Omega\text{cm}^2$  gemessen<sup>39</sup>.

Durch Kokulturen mit Astrozyten läßt sich auch *in vitro* eine höhere Integrität der TJs erreichen, darauf soll im weiteren Verlauf genauer eingegangen werden.

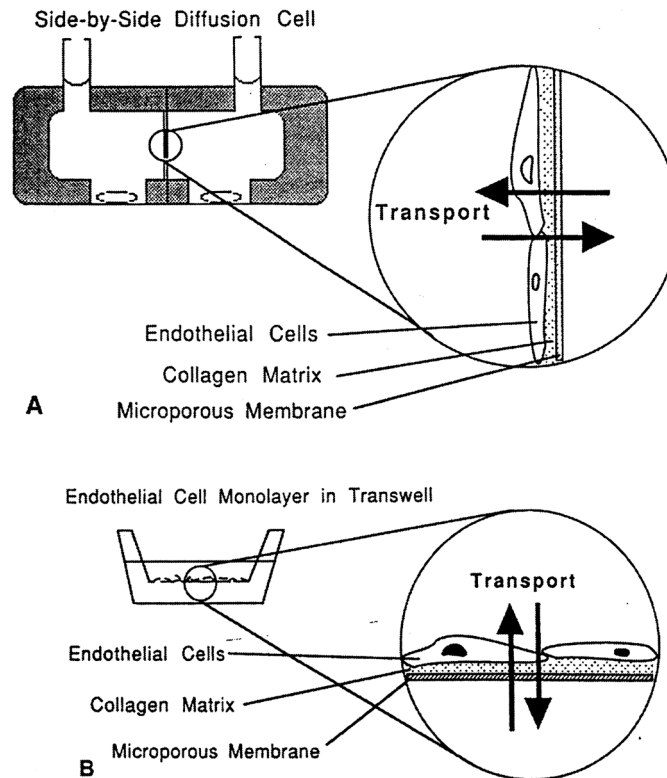


Abb. 5 Experimentelle Systeme für Transportstudien an mikrovaskulären Hirnendothelzellen *in vitro* (A) Side-by-side diffusion cell system; (B) Transwell system. Quelle: Takakura<sup>40</sup>.

## 1.7. Einfluß von Astrozyten auf Eigenschaften der Bluthirnschranke

Obwohl die isolierten Primärkulturen von Endothelzellen in der Lage sind feste interzelluläre Verbindungen zu schaffen<sup>41</sup>, zeigten Tao-Cheng et al., daß nach Kokultivierung von Hirnendothelzellen und Astrozyten, eine deutliche Verbesserung der endothelialen TJs in Bezug auf Länge, Weite und Komplexität nachweisbar war<sup>42</sup>. GJs, häufig bei *in vitro* kultivierten Endothelien nachweisbar, gingen merklich in ihrer Anzahl zurück. Bei Astrozyten, einer Art von Gliazellen, handelt es sich um sternförmige Zellen, die im ZNS eng mit neuronalem, ventrikulärem, meningealem und endothelialem Gewebe assoziiert sind<sup>43</sup>.

Die Fortsätze der Astrozyten, sogenannte Endfüßchen (Endfeet) berühren die Basalmembran der Endothelzellen und umgeben den gesamten Endotheliumschlauch <sup>44</sup>.

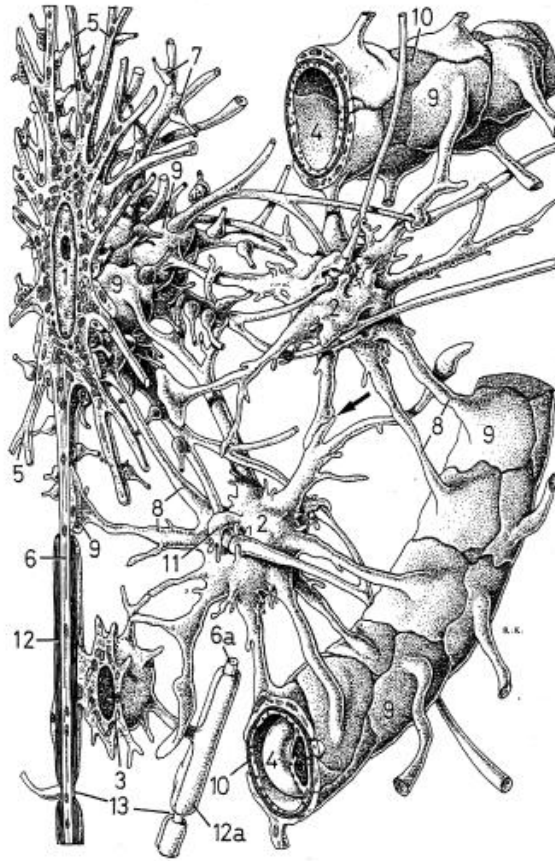


Abb. 6 *Glia des Zentralnervensystems, Membrana limitans perivascularis*  
 (1) Nervenzelle, (2) Astrozyt, (3) Oligodendrozyten, (4) Blutkapillare, (5) Dendrit, (6, 6a) Axon, (7) Endknöpfe, (8) Ausläufer, (9) plattenförmige Endigung, (10) basallaminafreier Bezirk, (11) Ausstülpung, (12, 12a) Markscheide, (13) Ranvier'scher Schnürring). Quelle: R.V.Krstic', *Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere*

Es wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, daß Astrozyten in der Lage sind Eigenschaften der Bluthirnschranke zu induzieren. <sup>45-47</sup>. Dies scheint durch die Freisetzung eines oder mehrerer bislang nicht identifizierter Faktoren bedingt zu werden, wodurch BMEC zur Expression eines differenzierten Phänotyps angeregt werden. Dieser zeichnet sich durch insgesamt festere Tight Junctions mit konsekutiv erhöhtem elektrischen Widerstand gegenüber BMEC-Monolayern, welche in Abwesenheit von Astrozyten kultiviert wurden, aus.



## **1.8. Pathologische Prozesse an der Bluthirnschranke**

Kennzeichnend für nahezu alle pathologischen Prozesse an der Bluthirnschranke ist der zumindest partielle Verlust ihrer eigentlichen Funktion: Anstiege in der Permeabilität sind nahezu immer die Folge. Unterschiedlich sind jeweils nur die Gründe aus denen der Verlust ihrer Schrankenfunktion resultiert.

Länger andauernde ischämische Phasen im Gewebe stellen einen Hauptgrund für den Verlust der Schrankenfunktion dar. Mit zunehmender Dauer der ischämischen Phase wird ein Schrumpfungsprozeß der Endothelzellen nachweisbar, der zu erhöhter Permeabilität der Bluthirnschranke führt. Dies führt u. a. zu einem zunehmenden Verlust der Homöostase, zu konsekutivem Wassereinstrom in das betroffene Gebiet und zur Ödembildung. Gravierende Folge dieses Ungleichgewichtes ist schließlich der Gewebsuntergang.

## **1.9. Rolle des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) unter pathologischen Bedingungen**

Unter pathologischen Bedingungen wie Hypoxie werden verschiedene Faktoren produziert u. a. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)<sup>48-52</sup>. VEGF fördert in vitro das Zellwachstum und die Migration<sup>53,54</sup>, in vivo stimuliert VEGF die Angiogenese<sup>55,56</sup> und steigert die vaskuläre Permeabilität<sup>57-61</sup>. Bei VEGF handelt es sich um ein homodimeres Glykoprotein, daß verschiedene Isoformen aufweist, und in einer Größe von 34-46kDa vorliegt. In Tumoren ist die VEGF-Produktion in ischämischen Regionen lokalisiert<sup>52,62</sup>. Berse und Brown zeigten, daß VEGF für eine Permeabilitätssteigerung in Blutgefäßen solider Tumoren verantwortlich ist<sup>63</sup>. Weiter führte man die erhöhte Aszitesentstehung bei einigen Tumoren auf VEGF zurück<sup>64</sup>. Caplan und Schwartz zeigten, daß in Arealen verstärkter Replikation von Endothelzellen eine erhöhte vaskuläre Permeabilität nachweisbar ist. In der Regulation zerebraler Permeabilität spielt VEGF eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung des ischämisch-induzierten vasogenen Hirnödems<sup>65</sup>.

VEGF-induzierte endotheliale Hyperpermeabilität wird durch einen direkten Einfluß auf Endothelzellen verursacht<sup>66</sup>. Weiterhin wird vermutet, daß dieser Vorgang im Zusammenhang mit einer erhöhten Transzytose, mit Gap-Bildungen zwischen den Zellen<sup>65,67</sup> und einer Fenestrierung in sonst unfenestriertem Endothel einhergeht<sup>58,68</sup>. Kevil et al. wiesen eine durch VEGF gesteigerte Permeabilität für Moleküle wie Albumin nach<sup>69</sup>. In ihren Untersuchungen behandelten sie Zellmonolayer mit VEGF und fanden nach langen Inkubationszeiten einen signifikanten Anstieg der Permeabilität gegenüber C14-markiertem Albumin. In

Monolayern, die mit hitzedenaturiertem VEGF behandelt worden waren, konnte der Permeabilitätsanstieg nicht nachgewiesen werden. Es wurde weiter gezeigt, daß VEGF seine Permeabilitätsveränderungen mit Hilfe von Stickstoffmonoxid (NO) als sogenanntem „second messenger“ induziert, was durch verschiedene Studien weiter bestätigt wurde <sup>30,70</sup>.

In vorangegangenen Studien von S. Fischer wurde mit Hilfe eines *in vitro*-Modells der Bluthirnschranke, bestehend aus Schweinehirnendothelzellen (Brain microvascular endothelial cells, BMEC) bereits gezeigt, daß durch autokrin produziertes VEGF unter Hypoxie ein Anstieg der Permeabilität erfolgt.

Weitere vorangegangene Studien zeigten, daß VEGF die mikrovaskuläre Permeabilität über eine Signalkaskade mit Hilfe von Stickstoffmonoxid (NO) bewirkt <sup>62</sup>. Um zu eruieren, ob VEGF die Permeabilitäts erhöhungen unter hypoxischen Bedingungen mit Hilfe einer Induktion der NO-Synthese bewirkt, wurde den Endothelzellmonolayern unter Hypoxie L-NMMA, ein spezifischer Inhibitor der Synthese des Stickstoffmonoxids, zugefügt. Hierbei wurde gezeigt, daß unter Zugabe von 100 µM L-NMMA die Hypoxie-induzierte Permeabilitätszunahme vollständig unterdrückt werden konnte. Daraufhin wurde vermutet, daß die Permeabilitätsveränderungen durch VEGF-induzierte Stickstoffsynthese getriggert werden.

Fischer et al. wiesen ebenfalls nach, daß diese Veränderungen unter normoxischen Bedingungen unter Zugabe von L-NMMA nicht eintraten. Weiterführende Untersuchungen zeigten dann, daß unter Zugabe von SNP, einem potenten Stickstoffdonor, die Permeabilität unter normoxischen Bedingungen anstieg, und zwar im gleichen Ausmaß wie unter hypoxischen Bedingungen.

Aufgrund der geringen Halbwertszeit des NO wurden Überlegungen angestellt, daß die unter normoxischen Bedingungen nicht zu induzierenden Effekte des VEGF durch schnelle Antioxidationsreaktionen des NO unterdrückt werden.

Dies wurde bereits in Studien von Kharitonov und Rubbo dargestellt <sup>71,72</sup>.

Aufgrund dieser Vorstellungen wurde der Effekt des VEGF unter normoxischen Bedingungen unter Zugabe eines Antioxidantiums untersucht. Hierbei wurde den Endothelzellmonolayern unter Normoxie Liponsäure zusammen mit VEGF (5 ng/ml) hinzugefügt, woraufhin die Permeabilität der Monolayer signifikant anstieg. In Kontrollversuchen wurden den Monolayern nur VEGF zugegeben, wobei die beschriebenen Effekte ausblieben. Daraus könnte gefolgert werden, daß VEGF nur unter hypoxischen Bedingungen oder bei Vorhandensein von Antioxidantien in der Lage ist die Permeabilität von Endothelzellen zu steigern.

### **1.10. Zielsetzung der Arbeit**

Aufgrund der vorangegangenen Studien von S. Fischer sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Hypoxie einen Permeabilitätsanstieg auslöst, der über den parazellulären Transportweg erfolgt. Dazu sollte die Expression des ZO-1 als Protein der Tight Junction untersucht werden. Da VEGF als Mediator vaskulärer Permeabilitätsanstiege bekannt ist, sollte weiterhin untersucht werden, ob der hypoxieinduzierte Permeabilitätsanstieg des Endothelzellmonolayers durch einen VEGF Antikörper verhindert werden kann, um einen Hinweis dafür zu bekommen, ob VEGF auch an parazellulären Permeabilitätsanstiegen beteiligt ist. Desweiteren sollte die Bedeutung der Beteiligung von Astrozyten am Aufbau der Bluthirnschranke und an deren Aufrechterhaltung unter hypoxischen Bedingungen mit Hilfe eines *in vitro* Modells näher untersucht werden.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Arbeiten in der Zellkultur

Verwendete Zelllinien waren Gehirndothelzellen vom Schwein (BMEC), immortalisierte Gehirndothelzellen von der Ratte (RBE4), Astrozyten aus Rattengehirn, C6-Gliomazellen und Epithelzellen (CSG) aus Submandibulardrüsen Gewebe der Maus.

Sämtliche Arbeiten mit eukaryontischen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### 2.1.1. Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden bei 37°C in feuchter Atmosphäre unter 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten und ein rasches Absterben der Zellen zu verhindern, wurde – in Abhängigkeit von der Zelldichte auf der Zellkulturschale – alle zwei bis drei Tage das Medium gewechselt, oder die Zellen wurden nach Ablösung von der Zellkulturschale mit Trypsin-EDTA-Lösung (Life Technologies) im Verhältnis 1:3 bis 1:6 mit Medium verdünnt und passagiert. Bei BMEC und C6-Zellen wurde M 199 Medium (Life Technologies) mit Zusätzen als Kulturmedium verwendet. Bei Astrozyten wurde BME-Medium mit Zusätzen, bei RBE4-Zellen Dulbecco's Mod. Eagle Medium / Nutmix/F12 (Life Technologies) und bei CSG-Zellen Dulbecco's Mod. Eagle Medium (Life Technologies) verwendet.

<b>BMEC-Medium</b> (auch für C6 - Zellen)	<ul style="list-style-type: none"><li>• M 199 – Medium</li><li>• 20% FCS (Fötales Kälber Serum)</li><li>• 2% Penicillin-Streptomycin</li><li>• 1% Amphotericin B</li></ul>
<b>RBE4-Medium</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Dulbecco's Mod. Eagle Medium/F12 - Nutmix</li><li>• 10% FCS</li><li>• 1 ng/ml Human FGF (100-18B, Pefrotech)</li><li>• 225 µg/ml G418</li></ul>
<b>Astrozyten -Medium</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• BME - Medium</li><li>• 10% FCS</li><li>• 1% Gentamycin</li><li>• 1% Glutamin</li></ul>

**CSG-Medium**

(auch für C6 - Zellen)

- DMEM - Medium
- 10% FCS
- 2% Penicillin-Streptomycin

**2.1.2. Passagieren der Zellen**

Konfluent gewachsene Zellen wurden nach Abziehen des alten Mediums mit 0,05% iger Trypsin-EDTA-Lösung (pH 7,2) überschichtet. Um die Verteilung der Trypsin-EDTA-Lösung zu gewährleisten, wurden die Kulturflaschen geschwenkt und die Trypsin-EDTA-Lösung dann wieder abgezogen. Nach Wiederholen dieses Vorgangs wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop das Ablösen der Zellen beobachtet. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und auf neue Kulturflaschen gesplittet.

**2.1.3. Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsiniert und zentrifugiert (1100 rpm, 4 min., RT, Rotanta/RPC von Hettich). Das Sediment wurde in FCS (Life Technologies) aufgenommen. Zur Zellsuspension wurde Kulturmedium mit 20% Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck) im Verhältnis 1:1 langsam hinzugefügt. Aliquots von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml wurden vorsichtig in Cryoröhrchen (Nunc) transferiert und durch langsames Abkühlen bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Zum längeren Aufbewahren wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Beim Auftauen der Zellen wurde eine Zellportion auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt und mit 10 ml Medium verdünnt. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (1100 rpm,  $25^\circ\text{C}$ , 4 min., Rotanta/RPC, Hettich), das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert.

Nach wiederholter Resuspension in 10 ml Medium wurden die Zellen auf eine kollagenbeschichtete  $75\text{cm}^2$  große Kulturschale ausgesät.

**2.1.4. Herstellung von konditioniertem Medium**

Bei konditioniertem Medium handelt es sich um Medium, das von konfluenten Zellkulturen unter definierten Bedingungen gewonnen wird. Hierzu werden die Zellen (in unserem Fall Astrozyten, C6- und BSMC-Zellen) bis zur Konfluenz kultiviert und mit PBS gewaschen. Anschließend wird frisches Medium ohne FCS zugesetzt und die Zellen 24 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Medium abgenommen, mit Hilfe eines sterilen Filters ( $0,2\ \mu\text{m}$ ) filtriert und bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zum Gebrauch eingefroren. Die Zellen werden verworfen.

## 2.2. Verwendete Zelltypen

### 2.2.1. Isolierung von BMEC (Brain microvascular endothelial cells)

#### *Vorbereitung*

Etwa 10 Schweinegehirne von frisch geschlachteten Schweinen wurden in 70% Isopropanol auf Eis vom Schlachthof transportiert.

Nach dem Transport wurden die Gehirne direkt in 37°C warmen Earle Salz Puffer + NaHCO<sub>3</sub> überführt.

Tabelle 1: Earle - Puffer (Ansatz für 1l)

NaCl	6800 mg
KCl	400 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	140 mg
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	200 mg
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	200 mg
D - Glucose	1000 mg
Mit H <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen + autoklavieren	+ NaHCO <sub>3</sub> : 2200 mg (steril filtrieren)

#### *Entfernen der Hirnhäute und mechanische Zerkleinerung*

Nach kurzem Abflammen der Hirne wurden die Hirnhäute, Fettgewebe, Kleinhirn und Hirnstamm entfernt.

Anschließend erfolgte die Zerkleinerung der Gehirne mit Hilfe von Skalpell auf einer sterilen Glasplatte.

#### *Enzymatische Verdauung*

Die zerkleinerten Gehirne wurden dann in ein Becherglas mit 200 ml BMEC-Medium ohne FCS gegeben und dann in Abständen unter Rühren Dispase (Ansatz: 0,8 mg/100 ml) hinzugegeben.

Die Suspension wurde dann bis zum Eintritt der Homogenisierung etwa zwei Stunden bei 30°C gerührt.

### *Erster Gradient mit Dextran*

Im Anschluß wurden jeweils 100 ml des Homogenisates mit 150 ml 15% Dextran +  $\text{NaHCO}_3$  versetzt und geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension bei 6800 rpm für 10 Minuten bei 4°C (Sorvall-GS-3) zentrifugiert. Der vornehmlich aus Fett bestehende Überstand wurde verworfen und die abzentrifugierten Pellets in BMEC-Medium ohne FCS aufgenommen.

### *Filtration*

Die Zellsuspension wurde durch ein autoklaviertes Nylonsiebgewebe in ein Becherglas filtriert.

### *Inkubation*

Dem Filtrat wurden 70mg Kollagenase/Dispase in 3 ml Medium aufgenommen zugesetzt und anschließend wurde die Zellsuspension im Wasserbad bei 37°C für fünf Stunden unter leichtem Schütteln inkubiert.

### *Zweiter Gradient: Percoll*

Während der Inkubationszeit wurde der zweite Gradient bestehend aus 36 ml Percoll, 70 ml Earle Salz Puffer +  $\text{NaHCO}_3$ , sowie 2,6 ml M199-Medium-Konzentrat (10x) vorbereitet und im Kühlschrank aufbewahrt.

Eine Stunde vor Ablauf der Inkubationszeit wird dieser Gradient bei 14200 rpm, 4°C für 60 Minuten zentrifugiert (SW 28, Beckmann, UZ).

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension bei 2360 rpm, 4°C 10 Minuten zentrifugiert (Rotanta, RPC, Hettich).

Das Sediment wurde in 4 ml BMEC-Medium ohne FCS aufgenommen und anschließend damit der zweite Gradient überschichtet.

Es schloß sich ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 2800 rpm, 4°C, 10 Minuten an (Beckmann, UZ).

Anschließend wurde die Mediumphase bei 2380 rpm 10 Minuten abzentrifugiert und zum ersten Zellpellet gegeben.

Dieses Zellpellet wurde nach einer sich anschließenden Dichteüberprüfung in die entsprechende Menge 50% FCS und 50% BMEC-Medium mit 20% DMSO aufgenommen und eingefroren.



### *Einfrieren*

Pro einzufrierender Ampulle benötigt man 0,5 ml reines FCS und 0.5 ml 20% DMSO in BMEC-Medium ohne FCS.

Hierzu nimmt man das Zellpellet in der entsprechenden Menge an reinem FCS auf und überschichtet es tropfenweise mit dem Gemisch aus FCS und DMSO.

Anschließend muß das Zellgemisch direkt in Kryoröhrchen (Nunc) abgefüllt und eingefroren werden.

### **2.2.2. Isolierung von Astrozyten**

Zur Isolierung von Astrozyten wurden die Gehirne von etwa zwei Tage alten Ratten benötigt. Nach dem Töten der Ratten wurde der Kopf eröffnet und das Gehirn mit Hilfe eines kleinen Löffels entnommen. Die Gehirne wurden sofort in eine Petrischale auf Eis, in die 5 ml von Lösung 1 gegeben wurden, überführt. Mit Hilfe eines Mikroskops wurden die Hirnhäute entfernt und dann die Gehirne mit einem Skalpell in ca. 0,4 mm große Stückchen geschnitten. Das Gewebe wurde in ein Falconröhrchen mit 10 ml von Lösung 1 gegeben und eine Minute bei 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml von Lösung 2 versuspendiert. Daraufhin wurde das Falconröhrchen bei 37°C im Wasserbad für 15 Minuten leicht geschüttelt. Anschließend wurden 10 ml von Lösung 4 hinzugegeben und dann drei Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, dann wurden 2 ml von Lösung 3 dazugegeben, und die Suspension wurde ca. 25x mit einer Pasteur Pipette aufgezogen und vermischt. Im Anschluß wurde die Lösung fünf Minuten ruhen gelassen. Der Überstand, der sich gebildet hatte, wurde in eine anderes Falconröhrchen mit 3 ml von Lösung 5 gegeben. Das Pellet wurde dann wiederholt mit 2 ml von Lösung 3 versetzt, 25x gemischt, und nach dem Absetzen wurde dieser Überstand zum ersten Überstand gegeben. Nach weiterem fünfminütigen Absetzen wurde das Pellet verworfen und der Überstand für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml Medium (BME-Medium) aufgenommen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur in unbeschichtete Kulturfラスchen gegeben, um Mikroglia und Makrophagen adhären zu lassen. Nach 20 Minuten wurde die Lösung abgezogen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in Astrozyten-Medium aufgenommen und auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Petrischalen ausgesät. Pro Gehirn hat man etwa eine Ausbeute von  $7-8 \times 10^6$  Zellen.

Tabelle 2: Lösungen

<b>KRB (10x) in Aqua dest.</b>	<b>Bei - 20°C für Monate haltbar Sonstige Lösungen frisch steril filtriert einen Tag vor der Isolierung herstellen, bei 4°C aufbewahren</b>
Lösung 1	100 ml KRB 1x 0,3 g BSA (Sigma, A4503) 0,8 ml MgSO <sub>4</sub> + 7 H <sub>2</sub> O 3,82%
Lösung 2	25 ml von Lösung 1 6,25 mg Trypsin (Sigma T8253)
Lösung 3	15 ml von Lösung 1 1,2 mg DNase 7,8 mg SB Trypsininhibitor 0,15 ml MgSO <sub>4</sub> – 3,82%
Lösung 4	21 ml von Lösung 1 4 ml von Lösung 2
Lösung 5	12,5 ml von Lösung 1 100 µl MgSO <sub>4</sub> 3,82% 15 µl CaCl <sub>2</sub> 1,2%

*Beschichtung mit Poly-L-Lysin*

Für die Beschichtung mit Poly-L-Lysin wird eine Lösung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:100 hergestellt. Die Lösung wird auf die Petrischalen gegeben und eine Stunde einwirken gelassen. Im Anschluß daran wird die Lösung abgezogen. Die Schalen stehen dann für das Aussäen der Astrozyten zur Verfügung.

**2.2.3. Isolierung von BSMC (nach Fallier-Becker <sup>73</sup>)**

Rinderaorten vom Schlachthof wurden in gekühlter Phosphat gepufferter Salzlösung (1x PBS) transportiert. Die Aorten wurden zusätzlich mit reichlich kaltem 1x PBS gewaschen und nach Entfernen von Bindegewebe und Fett (um eine Fibroblastenkontamination zu vermeiden) zwischen den abführenden Arterien mit einer Schere aufgeschnitten und auf einer sterilen Unterlage festgesteckt. Auf der Innenseite von Rinderaorten wurde mit einem sterilen Skalpell ein Schachbrettmuster eingeritzt. Mit einer Pinzette konnten dann die Media-Stücke von der darunterliegenden Adventitia entfernt, in Medium enthaltende Kulturflaschen gegeben und über Nacht senkrecht im Brutschrank inkubiert werden. Erst am nächsten Tag wurden die Kulturflaschen waagerecht gelegt, so daß die Mediastücke komplett mit Medium bedeckt waren. Nach ca. 4 Tagen konnte ein Auswachsen der glatten Muskelzellen aus den Mediastücken beobachtet werden. In regelmäßigen Abständen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und nach 14 Tagen die

Mediastücke wieder entfernt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert, routinemäßig in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in einer Zelldichte von  $8 \times 10^4$  Zellen/ml ausgesät. Die Zellen wurden in Passage 2 eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Tabelle 3: Zusammensetzung von PBS (Phosphate Buffered Saline)

PBS		Gramm/Liter Aqua dest.	pH (gesamt) 7,35
NaCl	137,0 mM	7,94	
KCl	12,7 mM	0,2	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM	0,2	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,0 mM	1,15	

#### 2.2.4. Zelllinien

##### *C6-Gliomazellen*

Bei den C6-Gliomazellen handelt es sich um Zellen einer Astrozytoma-Zelllinie. Somit sind C6-Zellen aus Astrozytenzellen entwickelte Tumorzellen.

##### *RBE4-Zellen*

Bei den RBE4-Zellen handelt es sich um eine aus Rattenhirnendothel gezogene Zelllinie, die durch Einklonierung des Plasmids pE1A-neo, das die E1A-Region des Adenovirus 2 und ein Resistenzgen gegen Neomycin enthält, entstanden ist.

Bevor die Zellen für *in vitro*-Versuche eingesetzt werden konnten, mußte sichergestellt sein, daß diese Zellen zu einem gewissen Grad die Eigenschaften von Primärkulturendothelzellen bewahrt haben.

In vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, daß RBE4-Zellen den endothelialen Phänotyp aufweisen<sup>74,75</sup>, daß sie Differenzierungen von Hirnendotheleigenschaften in Anwesenheit von Faktoren des Gliagewebes zeigen<sup>76</sup>, ATP-Rezeptoren von ähnlichen pharmakologischen Eigenschaften wie in Primärkulturen vorhanden exprimieren, und sie ebenfalls NO und Endothelin sezernieren<sup>77,78</sup>.

##### *CSG-Zellen*

Bei den CSG-Zellen handelt es sich um die Zelllinie CSG 120/7, einer Epithelzelllinie aus explantierten Submandibulardrüsen Gewebe der Maus.

Ultrastrukturanalysen zeigten, daß es sich bei CSG 120/7 um gut differenzierte Epithelzellen handelt, die typische junctionale Komplexe ausbilden<sup>79</sup>. Somit handelt es sich bei den CSG-Zellen um epitheliale Zellen, die in der Lage sind typische Proteine der Tight und Adherens Junctions zu exprimieren.

### **2.2.5. Kokulturen**

Für einige Versuche wurden Kokulturen benötigt. Daher wurden Astrozytenkulturen und C6-Zell-Kulturen trypsinisiert, in frischem Kulturmedium aufgenommen und auf dem Boden von 24 well Kulturplatten in einer Dichte von 6000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Nach 2-3 Tagen bei Erreichen der Konfluenz wurden die Filtereinsätze mit frisch eingesäten BMEC in die Einsätze gestellt. In dieser Form der Kokultur wurden die Zellen weitere 2-4 Tage länger kultiviert bis die BMEC ebenfalls konfluent vorlagen.

## **2.3. Charakterisierung der verwendeten Zelltypen**

### **2.3.1. Charakterisierung von Endothelzellen**

Zusätzlich zur Morphologie wurden immunhistologische Methoden zum Nachweis von Endothelzellen eingesetzt. Die Aufnahme der Endothelzellen von acetyliertem „low density protein“ (LDL) und das Vorhandensein des Von-Willebrand-Faktors dienten als Positivkontrolle für Endothelzellen. Mit einem Antikörper gegen  $\alpha$  - „smooth muscle actin“ (Aktin der glatten Muskelzellen), das nicht in Endothelzellen vorhanden ist, wurde eine Negativkontrolle durchgeführt.

BMEC wurden in einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen pro well auf Multitest-Objektträger (Dunn) ausgesät, und es wurde in regelmäßigen Abständen ein Mediumwechsel durchgeführt bis die Zellen subkonfluent vorlagen.

Zur LDL-Aufnahme (Paesel + Lorei GmbH & Co.), das mit 1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindo-Carbocyanin Perchlorat markiert ist, wurden die Zellen vier Stunden in einer feuchten Kammer bei 37°C mit markiertem LDL (Endkonzentration: 10 µg/ml Endothelzellmedium) inkubiert. Nach zweimaligem fünfminütigen Waschen der Objektträger mit Medium, wurden die Zellen zwei Minuten in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach einem erneuten Waschgang mit 1x PBS wurde eine Kernfärbung mit 4,6-diamino-2-Phenylindol (DAPI) (Molecular Probes) durchgeführt. Nach 20 Minuten wurde die DAPI-Lösung durch

zweimaliges Waschen mit 1x PBS entfernt, und die Objektträger wurden mit Mowiol eingedeckelt.

Der Nachweis des Von-Willebrand-Faktors wurde mit dem Antikörper F-3520 Anti-Human Von-Willebrand-Faktor (Sigma Immunochemicals) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in derselben Weise wie beim Versuch der LDL-Aufnahme. Nach einem kurzen Waschschrift in 1xPBS wurden die Zellen drei Minuten in Methanol fixiert. Es erfolgte ein erneutes Waschen mit 1x PBS, bevor der erste Antikörper in einer 1:80 fachen Verdünnung in 1xPBS aufgetragen wurde und für die Dauer von einer Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. An einen weiteren Waschschrift (dreimal fünf Minuten mit 1xPBS) schloß sich eine einstündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper „Biotin-SP-konjugiertem Affinity Pure Donkey Anti-Rabbit IgG“ (Jackson Immuno Research) in einer 160-fachen Verdünnung in 1x PBS bei Raumtemperatur an. Die Objektträger wurden erneut gewaschen (dreimal fünf Minuten mit 1x PBS), bevor sie mit dem dritten Antikörper „Cy<sup>2</sup>-konjugiertem Streptavidin“ (Rockland) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden (dieser Schritt diente der Intensivierung der Fluoreszenzreaktion des zweiten Antikörpers). Im Anschluß an die Färbung mit dem dritten Antikörper wurde eine Kernfärbung mit Propidiumjodid (Molecular Probes) durchgeführt. Nach einem letzten Waschschrift mit 1x PBS (zweimal fünf Minuten) wurden die Objektträger mit Mowiol eingedeckelt. Um eine Kreuzreaktion des 2. und 3. Antikörpers mit den Zellen auszuschließen, wurde eine Kontrolle durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit zweitem und drittem Antikörper behandelt, aber nicht mit dem ersten Antikörper, um so sicher zu stellen, daß eine Fluoreszenznachweis wirklich auf der Reaktion mit dem ersten Antikörper beruht. Die Behandlung mit dem A-2547 monoclonal „anti- $\alpha$ -smooth-muscle-actin“ (Sigma, Immunochemicals) wurde analog zur Behandlung mit dem Von-Willebrand-Faktor durchgeführt. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 in 1x PBS eingesetzt. In derselben Konzentration wurde auch der zweite Antikörper „Biotin conjugated Affinity Purified Anti-Mouse IgG“ (Rockland) eingesetzt. Auch hier wurde zur Intensivierung der Fluoreszenzreaktion der 3. Antikörper „Cy<sup>2</sup>-conjugated-Streptavidin“ (Rockland) benutzt und ebenfalls eine Kernfärbung mit Propidiumjodid durchgeführt. Eine Kontrolle, die sicherstellen sollte, daß keine Kreuzreaktion des 2. und 3. Antikörpers stattgefunden hat, wurde in analoger Weise wie bei der Von-Willebrand-Faktor-Färbung durchgeführt. Die Auswertung der o.g. immunhistologischen Färbungen erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM) mit den entsprechenden Filtern (N2.1 und I3) und wurde photographisch dokumentiert (Kodak Elite II 200).

Tabelle 4: Antikörper

<b>LDL - Test</b>	<b>Von - Willebrand - Faktor</b>	<b><math>\alpha</math> - smooth - muscle - Actin</b>
1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-Carbocyanin-Perchlorat markiertes LDL (4 Stunden)	1x waschen mit PBS, anschließend 3 Minuten fixieren mit Methanol, waschen mit PBS	Analog der Behandlung bei Nachweis des Von-Willebrand-Faktors
2x 5 Minuten waschen mit Medium	Antikörper F-3520 Anti-Human Von-Willebrand-Faktor (1:80, 1 Stunde)	Antikörper A-2547 monoclonal anti- $\alpha$ -smooth-muscle-actin (1:200 in PBS, 1 Stunde)
2 Minuten mit 4% PFA fixiert, anschließend waschen mit PBS	Waschen (3x5 min) 2. Antikörper Biotin conjugated Affinity Pure Donkey Anti-Rabbit-IgG (1:160, 1 Stunde)	Waschen (3x5 min) 2. Antikörper Biotin conjugated Affinity Purified Anti-mouse-IgG (1:200 in PBS, 1 Stunde)
	3x5min Waschen 3. Antikörper Cy <sup>2</sup> -conjugated Streptavidin (1 Stunde)	3x5 min Waschen Antikörper Cy <sup>2</sup> - conjugated Streptavidin (1 Stunde)
Kernfärbung mit 4,6-diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (20 min.)	Kernfärbung mit Propidiumjodid	Kernfärbung mit Propidiumjodid

### 2.3.2. Charakterisierung von Astrozyten

Astrozyten wurden über die Expression des „glial fibrillary acidic proteins“ (GFAP) charakterisiert. Dazu wurden die Zellen mit einem in Kaninchen entwickelten Antikörper gegen das „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) inkubiert. Die Behandlung mit dem „anti-cow glial fibrillary acidic protein“ Antikörper (DAKO) wurde analog zur Behandlung mit dem Von-Willebrand-Faktor durchgeführt. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 in 1x PBS eingesetzt. Auch hier wurde zur Intensivierung der Fluoreszenzreaktion der 3. Antikörper „Cy<sup>2</sup> conjugated Streptavidin“ (Rockland) benutzt und ebenfalls eine Kernfärbung mit Propidiumjodid durchgeführt. Eine Kontrolle, die sicherstellen sollte, daß keine Kreuzreaktion des 2. und 3. Antikörpers stattgefunden hat, wurde in analoger Weise wie bei der Von-Willebrand-Faktor - Färbung durchgeführt. Die photographische Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wurde wie unter Punkt 2.6 beschrieben durchgeführt.

### 2.3.3. Charakterisierung von glatten Muskelzellen

Die Morphologie der glatten Muskellzellen aus der Rinderaorta (BSMC) wird in der Literatur als „hill and valley“ Morphologie bezeichnet. Die immunhistologische Anfärbung der glatten Muskelzellen erfolgte in analoger Weise zu den Endothelzellen. Mit einem Antikörper gegen „ $\alpha$ -smooth-muscle-actin“ (Aktin der glatten Muskelzellen) wurde der Nachweis geführt. Die Aufnahme von acetyliertem „low density lipoprotein“ (LDL) und der Nachweis von Von-Willebrand-Faktor als Merkmal von Endothelzellen dienten als Negativkontrolle. Es wurden dieselben Antikörper in denselben Konzentrationen wie beim Endothelzellnachweis verwendet. Zusätzlich wurde noch eine Myosin-Anfärbung durchgeführt, bei der „anti-smooth and skeletal“ Myosin (Sigma Immunochemicals) verwendet wurde. Der in Kaninchen entwickelte Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:50 in PBS 1x verwendet. Der zweite und dritte Antikörper wurde wie bei der Von-Willebrand-Faktor-Färbung eingesetzt. Die photographische Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wurde wie unter Punkt 2.7.2 beschrieben durchgeführt.

## 2.4. Permeabilitätsversuche

Sechs bis acht Tage nach dem Aussäen der BMEC auf kollagenbeschichtete Filtermembranen wurde die Permeabilität des Endothelzellmonolayers bestimmt. Die gemessenen Widerstandswerte lagen zwischen 70 und 120  $\Omega\text{cm}^2$ , was mit den Ergebnissen von Erben et al. übereinstimmt<sup>20</sup>. Filter, die Widerstände von mehr als 100  $\Omega\text{cm}^2$  aufwiesen, wurden für die Messung der Passage von [ $^3\text{H}$ ] Inulin (Amersham, Buchler, Deutschland) oder Evansblue-Albumin über den BMEC-Monolayer verwendet.

### 2.4.1. Verwendete Marker: EBA (Evans blue albumin) und [ $^3\text{H}$ ] Inulin

Beim EBA handelt es sich um einen Standardmarker in Indikatorlösungen zur Bestimmung der Albuminclearance. Zu den besonderen Eigenschaften dieses Stoffes zählt insbesondere die Fähigkeit fest an Albumin zu binden. Eingesetzt wird EBA als qualitativer Marker zur Bestimmung der Durchlässigkeit von vaskulären Kompartimenten für Proteine. Weitere Vorteile des EBA sind die einfache Qualifizierung mittels Spektroskopie und die kostengünstige Beschaffung.

Der Evans blue-Farbstoff (6,6'-[(3,3'-dimethyl[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[4-amino-5-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonic acid] (Sigma) wurde in Wasser in der Konzentration von 2g/100 ml gelöst, filtriert und anschließend kühl aufbewahrt.

Aliquots der Stocklösung wurden in M199-Medium gelöst und 4% Bovines Serum Albumin (fraction V, charcoal treated, Sigma) zugegeben. Die Endkonzentration betrug 0,67 mg/ml in 4% Albumin. Tritium-markiertes Inulin wurde von der Fa. Amersham bezogen und konnte ohne weitere Veränderung in den benötigten Konzentrationen eingesetzt werden.

#### 2.4.2. Messung der Permeabilität

Den Filtern wurde vor Versuchsbeginn von der Seite, die der luminalen Seite der Kapillaren entspricht, Evansblue-Albumin oder Tritium-markiertes Inulin zugesetzt.

Hierzu wurde in den apikalen Teil der Filter, die die konfluenten Monolayer enthielten, 0,146 nmol [ $^3\text{H}$ ] Inulin oder 0,67 mg/ml 4% igem Albumin in 300  $\mu\text{l}$  M199-Medium ohne FCS gegeben. In den basolateralen Teil des Einsatzes wurden 500  $\mu\text{l}$  M199-Medium ohne FCS gegeben. Im Verlauf verschiedener Versuche wurden rekombinantes VEGF oder ein polyklonaler Antikörper gegen VEGF (PreproTech, London) oder  $\alpha$ -Liponsäure (thioctacid, Merck, Darmstadt) zu Beginn des Experimentes, wie im Ergebnissteil beschrieben, zugegeben, und die Filter dann unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen für jeweils 1,5, 3 und 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration des [ $^3\text{H}$ ] Inulins oder EBA, das im basolateralen Teil des Einsatzes nach Ablauf von unterschiedlichen Inkubationszeiten vorhanden war, gemessen. Als Kontrolle dienten Zellen, die für die entsprechenden Zeiten unter normoxischen Bedingungen inkubiert wurden.

Zur Bestimmung der Tracer-Konzentration, die den Endothelzellmonolayer nach Ablauf der Inkubationszeit passiert hatte, wurden Aliquots aus der abluminalen Seite entnommen. Die Konzentration des Evans-Blue-Albumins wurde photometrisch bestimmt und die des [ $^3\text{H}$ ] Inulin anhand der gemessenen cpm-Werte. Die Permeabilität des [ $^3\text{H}$ ] Inulin wurde durch den Quotienten ( $c_{\text{R}}/c_{\text{total}}$ ) ausgedrückt ( $C_{\text{R}}$ =Konzentration im abluminalen Kompartiment,  $C_{\text{total}}$ =Konzentration im luminalen Kompartiment). Die Konzentration des EBA wurden aus den Ergebnissen der Photometrie in  $\mu\text{g/ml}$  ausgedrückt. Während des Versuchs wurde darauf geachtet, daß das Verhältnis der Flüssigkeitsmengen im oberen und unteren Teil des Filters ausgeglichen war, und die Temperatur bei 37°C konstant blieb. Der Anteil von Inulin oder EBA, daß Filter ohne Zellbesatz passierte, veränderte sich nicht unter hypoxischen Bedingungen gegenüber normoxischen Bedingungen oder in Gegenwart von den verwendeten Agenzien.



## 2.5. *In vitro* Hypoxiemodell

Für alle Versuche, die unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt wurden, wurden konfluente BMEC-Monolayer zunächst mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde M199-Medium ohne FCS mit oder ohne beigefügte Agenzien den Monolayern zugesetzt. Danach wurden die Zellen in ein spezielles Kammersystem, welches mit Hilfe eines Thermostats eine gleichbleibende Temperatur von 37°C aufrechterhielt, gestellt. Die Kammern wurden zur Herstellung von hypoxischen (2% Sauerstoff) Verhältnissen mit einem Gasgemisch, das aus 93%N<sub>2</sub>, 2%O<sub>2</sub> und 5%CO<sub>2</sub> bestand, begast. Zur Kontrolle der Sauerstoffkonzentration wurde nach verschiedenen Zeitpunkten der Sauerstoffgehalt in der Zellkultur mit Hilfe eines Digital-O<sub>2</sub>-Meter (Schott Geräte GmbH, Deutschland) bestimmt. Die respiratorische Aktivität der Zellen hatte keinen signifikanten Einfluß auf den Sauerstoffgehalt des Zellkulturmediums. Der pH des Mediums blieb über einen Zeitraum von bis zu 24 Stunden unverändert. Zur Kontrolle wurden Zellkulturen für denselben Zeitraum unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Um die Permeabilitätsänderungen der Zellen unter hypoxischen Bedingungen quantifizieren zu können, wurden die Zellen auf kollagenbeschichtete Polycarbonatmembranfilter gesät, und nach Erreichen der Konfluenz diese in die Vertiefungen von 24well-Platten gestellt. Hierdurch sollte in diesem Modell an der apikalen Seite der Filter die luminale Seite, und an der basolateralen Seite die vom Lumen abgewandte Seite der von Endothelzellen ausgekleideten Kapillaren, dargestellt werden.

## 2.6. Zytotoxizitätstest (nach Mosmann <sup>80</sup>)

Mit Hilfe des CellTiter 96™ Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) wurde die Anzahl lebender Zellen in einer Zellkultur bestimmt. Die Methode beruht auf einer kolorimetrischen Umsetzung des blaß gelben Tetrazoliumsalzes MTT (enthalten in der Färbelösung) in ein dunkelblaues Formazanprodukt, welches in den Mitochondrien lebender Zellen stattfindet. In toten Zellen ist diese Umsetzungsreaktion nicht mehr möglich. Aufgrund dessen ist die bei 570 nm gemessene Absorption direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Der Zytotoxizitätstest wurde sowohl mit BMEC als auch mit CSG, RBE4 und BSMC durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in einer Ausgangskonzentration von 2x10<sup>4</sup> Zellen in 100 µl Endothelzellmedium pro Vertiefung einer mit Rattenschwanzkollagen beschichteten 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät. Unter subkonfluenten Bedingungen wurden die Zellen vor Beginn des Versuches zum Teil mit Medium ohne FCS, mit FCS, mit Astrozyten-konditioniertem Medium, C6-konditioniertem

Medium und mit BSMC-konditioniertem Medium behandelt und anschließend für die Dauer von sechs bzw. 24 Stunden in Kammern mit normoxischer oder hypoxischer Atmosphäre gestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde durch Zugabe von 15  $\mu$ l Farblösung je Vertiefung die oben beschriebene Umsetzung gestartet und vier Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 100  $\mu$ l Stopplösung pro Vertiefung (enthält 2-Propanolol zum Lösen der Formazankristalle) wurde die Umsetzung gestoppt und die Extinktion bei 570 nm gemessen. Die Formazanprodukte sind bei 4°C stabil und die Absorption kann noch Tage später gemessen werden.

## 2.7. Immunhistochemie

### 2.7.1. Vorbereitung des Probenmaterials für die Immunfluoreszenz

Für die immunhistochemischen Nachweise wurden Zellen auf kleinen mit Rattenschwanzkollagen vorbeschichteten Petrischalen – bei RBE4- und BMEC-Zellen, oder auf unbeschichteten Petrischalen – bei CSG-Zellen, ausgesät. Nach etwa sieben Tagen konnten die konfluenten Kulturen weiter bearbeitet werden.

### 2.7.2. Durchführung der Immunhistochemie

Zum Nachweis einzelner spezifischer Proteine der Zell-Zell-Kontakte wurden polyklonale Antikörper benutzt, die mittels Antigen-Antikörperreaktionen im Mehrschrittverfahren zur Sichtbarmachung der Proteine führten. Eine Ausnahme stellte die Verwendung von Phalloidin, ein giftiges Alkaloid von *Amanita phalloides*, dar, welches spezifisch an Aktin-Filamente bindet, und in Form fluoreszierender Derivate (Phalloidin, TRITC-labeled, Verdünnung 1:200 mit 2% Normal Goat Serum, Hersteller Sigma) zur Aktindarstellung zur Anwendung gelangte. Die Verdünnung der Antikörper sowie des Phalloidins erfolgte mit PBS.

Tabelle 5: Zusammensetzung von PBS (Phosphate Buffered Saline)

PBS		Gramm/Liter Aqua dest.	pH (gesamt) 7,35
NaCl	137,0 mM	7,94	
KCl	12,7 mM	0,2	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM	0,2	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,0 mM	1,15	

Nach Entfernung von Medium und Waschen mit PBS wurde die Fixierung der Zellen in 1% Paraformaldehyd (15 min. bei 4°C) durchgeführt. Es folgte erneutes Waschen mit PBS. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese mit 0,05% Triton (10 min) permeabilisiert und anschließend ein dreimaliges Waschen durchgeführt. Im Anschluß an den Waschgang wurden die Zellen mit 10% Normal Goat Serum in einer lichtgeschützten feuchten Kammer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang wurde der erste Antikörper in der entsprechenden Verdünnung aufgetragen und die Zellen für 60 Minuten in einer feuchten dunklen Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer, um einen Verlust der geringen Antikörpermengen durch Verdunsten zu verhindern.

Tabelle 6: Antikörper

Antikörper-bezeichnung	Antikörper-Herkunft	Antikörper-verdünnung	Hersteller
Antikörper Anti - ZO-1	Kaninchen	1:100	Jackson Immuno- Research Inc., USA, Vertrieb Dianova, Hamburg
2. Antikörper Cy <sup>2</sup>		1:400	

Während erneutem dreimaligen (3, 5 und 10 min) Waschens der Zellen mit PBS wurde der zweite Antikörper in einer Verdünnung von 1:400 mit PBS in der entsprechenden Menge angesetzt. Es handelte sich hierbei um einen Cy<sup>2</sup>-konjugierten Antikörper, der ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten lichtgeschützten Kammer inkubiert wurde. Beim Cy<sup>2</sup> handelt es sich um ein Fluorochrom, das eine starke Fluoreszenz ergibt und deutlich langsamer ausbleicht.

### *F-Aktin-Nachweis*

Für den F- Aktin-Nachweis wurde wie bereits beschrieben Phalloidin verwendet, welches an die Aktin-Filamente bindet, und in Form seiner fluoreszierenden Derivate Aktin zur Darstellung bringt. Hierzu wurde das Phalloidin in einer Verdünnung von 1:200 in PBS mit 2% Normal Goat Serum nach dem Blocken aufgebracht und für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten lichtgeschützten Kammer inkubiert.

### *Kerngegenfärbung*

Die Zellkerne wurden etwa eine Minute mit 4,6-diamidino-2-2Phenylindol (DAPI) gelöst 1:1000 in PBS gegengefärbt.

### *Eindecken der Präparate*

Die Präparate wurden mit Hilfe von Mowiol (Höchst, Frankfurt) eingedeckt. Dazu wurde ein geschliffenes Deckglas, welches mit Mowiol bestrichen wurde, vorsichtig auf die noch feuchten Objektträger aufgebracht und angedrückt. Die Eigenschaft einer sehr geringen Eigenfluoreszenz läßt Mowiol als besonders geeignet für die Immunhistochemie erscheinen.

### *Herstellung von Mowiol*

Die Lösung von 1 g Mowiol erfolgte in 4,0 ml PBS bei pH 8,0. Da Mowiol schwer löslich ist, war ein mindestens 16 stündiges Rühren notwendig, das nach Hinzufügen von 2 ml wasserfreiem Glycerin wiederholt wurde. Zur Entfernung meist noch vorhandener ungelöster Mowiolreste erfolgte 15 minütiges Zentrifugieren bei 12000 rpm. Danach wurde der Überstand abgefüllt und bei 8°C aufbewahrt.

### *Kontrollpräparate*

Negativkontrolle:

Bei Präparaten, die als Negativkontrolle dienten, wurde der 1. Antikörper nicht aufgetragen, alle anderen Schritte erfolgten wie beschrieben.

### *Fluoreszenzmikroskopie*

Die optische Auswertung der Präparate erfolgte an einem Mikroskop der Fa. Leica (Aristoplan) mit den Immersionsobjektiven 63x und 100x (MPL Fluotar 63/0,75 Oil und 100/1.0 Oil). Licht lieferte eine 5 W Quecksilberhochdrucklampe der Fa. Osram Typ HBO 50 W. Es wurden die Okulare Periplan GW 10x eingesetzt. Um die Präparate zur Fluoreszenz anzuregen, fand das Verfahren der Auflichtfluoreszenz Verwendung.

Tabelle 7: Immunfluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Anregungs- bereich	Anregungs- filter	Wellenlänge (Excitation)	Wellenlänge (Emission)
TRITC- Phalloidin	rot	O-5723, O-5728	550 nm	580 nm
Propidium- jodid	rot	O-5725, O-5729	535 nm	617 nm

## 2.8. F-Aktin-Assay

Mit Hilfe dieses Assays sollte bestimmt werden, inwieweit sich der Gehalt an F-Aktin im Vergleich zwischen normoxischen und hypoxischen Bedingungen – und unter Zusatz eines Antikörpers gegen VEGF verändert oder konstant bleibt. Zur Bestimmung des F-Aktin-Gehaltes wurde eine Methode verwandt, die von Kuhne et al. etabliert worden ist<sup>81</sup>. Veränderungen des Gehaltes an F-Aktin könnten Hinweise auf eine mögliche Korrelation von Umstrukturierungen des Cytoskelettes und einer daraus resultierenden Permeabilitätsänderung geben. Es wurden BMEC auf kollagenbeschichteten Petrischalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Den konfluenten Zellen wurde dann FCS-freies Medium zugesetzt, und die Zellen wurden für die Dauer von 24 Stunden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen mit und ohne polyklonalen Antikörper gegen VEGF inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 4% Paraformaldehyd-PBS für 15-30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 0,5% Triton x-100 in PBS fünf Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellmonolayer mit 1 µg/ml Tetramethylrhodamin-5-(-6-) isothiocyanat (TRITC-) Phalloidin (Sigma) für eine Stunde bei Raumtemperatur behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen fünf Mal mit PBS gewaschen und daraufhin das gebundene Phalloidin mit Hilfe von Methanol unter Lichtabschluß extrahiert. Die Messung erfolgte mit dem Fluoreszenzspektrometer (542nm). Die Berechnung der Fluoreszenz der Extrakte erfolgte mit Hilfe einer Standardkurve, wobei TRITC-Phalloidin als Standard eingesetzt wurde.

## 2.9. Arbeiten mit Proteinen

### 2.9.1. Protein-Isolierung für den Western Blot

Nachdem die konfluenten Zellen 24 Stunden in Hypoxie oder Normoxie inkubiert worden waren, wurden die Zellen mit PBS + PMSF (500 µM) gewaschen und anschließend mit ca. 1ml Lysispuffer pro 28 cm<sup>2</sup> Kulturschale versetzt und für ca. 60 Minuten bei 4°C leicht geschüttelt.

Tabelle 8: Lysispuffer

Puffer 1	Proteasemix (Endkonzentrationen)
1% Triton X100	1 $\mu$ g/ml Leupeptin
0,4% SDS	1 $\mu$ g/ml Chymostatin
1 mM EDTA	1 $\mu$ g/ml Pepstatin
10 mM TRIS/HCl pH 7,4	0,5 mM PMSF Vor Benutzung 0.1 ml des Mixes zu 10 ml von Puffer 1 geben

Anschließend wurden die Kulturschalen mit einem Scrabber abgeschabt und die Proben homogenisiert. Dann wurden die Proben bei 13.000 U, 4°C 15 Minuten abzentrifugiert und Überstände und Zellpellets gesondert bei -20°C eingefroren.

#### *Bestimmung des Proteingehaltes*

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit dem Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad) durchgeführt. Diese Methode beruht auf der von Lowry beschriebenen Reaktion von Proteinen mit einer alkalischen Kupfertartratlösung und dem Folinreagenz. Wie beim Lowry assay sind zwei Schritte für die Farbentwicklung nötig: Die Reaktion zwischen dem Protein und Kupfer in alkalischer Lösung und die daran anschließende Reduktion des Folin-Reagenzes durch das kupferbehandelte Protein. Eine Farbentwicklung ist hauptsächlich auf die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan und weniger auf Cystein und Histidin zurückzuführen. Proteine erzielen eine Reduktion des Folin-Reagenz durch Verlust eines, zweier oder dreier Sauerstoffatome. Dadurch werden eine oder mehrere mögliche reduzierte Formen mit charakteristischen Blaufärbungen mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm und einem Absorptionsminimum bei 405 nm erzielt. Es wurde ein Proteinstandard von 200-1400  $\mu$ g/ml in Lysispuffer angesetzt. Je 5  $\mu$ l des Standards und 5  $\mu$ l der Proteinproben in Lysispuffer wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Zu jedem Ansatz wurden 25  $\mu$ l der Lösung A' (1ml A + 20  $\mu$ l S = A') und 200  $\mu$ l der Lösung B gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde vorsichtig geschüttelt und 15 Minuten inkubiert, bevor bei 570 nm die Extinktion (BIOMEK) gemessen wurde. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurden 20-50  $\mu$ g zur SDS-PAGE-Polyacrylamid-Elektrophorese verwendet, oder 100  $\mu$ g Gesamtproteinmenge wurden immunpräzipitiert und danach auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

*Immunpräzipitation der Überstände*

Jeweils 100 µg Gesamtproteinmenge der Überstände wurden auf gleiches Volumen aufgefüllt und mit dem ersten Antikörper (1 µg / 100 µg totales Protein) Anti-rabbit-ZO-1 für 1-3 Stunden bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde Protein-A-Sepharose (100 µl/ml ) zugegeben und die Proben über Nacht bei 4°C gerollt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben 5 Minuten bei 2500 rpm, 4°C abzentrifugiert, und anschließend mit Lysispuffer gewaschen.

*SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese*

Zum Auftrennen der Proteine wurden die Zellysate-Proben nach oder ohne Immunpräzipitation auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Das vertikal orientierte Gel weist eine Zweiteilung in Sammel- und Trenngel auf. Die gestreckten Polypeptidketten wandern im elektrischen Feld zunächst durch das Sammelgel, dann durch das Trenngel zur Anode. Das Sammelgel ist gegenüber dem Trenngel grobporiger, der pH-Wert des Sammelgels ist zwei Größeneinheiten niedriger und es weist eine wesentlich geringere Leitfähigkeit auf. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der aufgetrennten Proteine lief immer ein Marker (Rainbow™ coloured protein molecular weight marker, Amersham) aus einem Gemisch aus Proteinen mit bekannten Molekulargewichten mit. Zellysate, die 100 µg Gesamtprotein enthielten, wurden im Vakuumtrockner einrotiert und in 14 µl Wasser aufgenommen. Dazu wurden noch 7 µl Lämmli-Puffer, der bereits β-Mercaptoethanol enthielt, pipettiert, bevor die Proben 5 Minuten bei 95°C denaturiert und dann mit einer Hamiltonpipette auf das Gel aufgetragen wurden. Das Gel hatte eine Laufzeit von ca. 2 Stunden bei 100V.

Tabelle 9: Minigele

<b>5% Deckgel</b>	<b>7,5% Trenngel</b>
225 µl Acrylamid (40% + 1,07% Bisacrylamid)	1,88 ml Acrylamid
500 µl 0,5 M TRIS/HCl pH 6,8	3,75 ml TRIS/HCl pH 8,8 (1M)
1,25 ml Aqua dest.	4,08 ml Aqua dest.
20 µl 10% SDS	0,1 ml 10% SDS
5 µl TEMED (N,N,N6,N6 – Tetramethylethylendiamin)	170 µl 10% APS
12,5 µl 10% APS (Ammoniumperoxidisulfat)	22,5 µl TEMED

### 2.9.2. Western Blot

Mit der Western-Blot-Technik ist es möglich, Proteine aus SDS-PAGE-Gelen auf Nitrocellulose- oder Nylon-Membranen zu übertragen und später mit einem spezifischen Antikörper zu detektieren. Nach Entnahme des Gels aus der Elektrophoreseapparatur erfolgte das Blotting in einer Semi-dry-Vorrichtung. Bei einer solchen Vorrichtung erfolgt der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran zwischen zwei horizontal angeordneten Plattenelektroden. Auf vier Lagen transferpuffergetränktes Whatman- 3 MM-Papier (Whatmanpapier) wurde die ebenfalls in Transferpuffer getränkte Nitrozellulosemembran (Hybon Tm ECL TM, Amersham Life Science) luftblasenfrei gelegt. Auf die Membran wurde luftblasenfrei das Gel und auf dieses vier Lagen transferpuffergetränktes Whatmanpapier gelegt. Die Apparatur wurde verschlossen und der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte für 2 Stunden bei  $1 \text{ mA/cm}^2$ .

Tabelle 10: Transferpuffer

5,81g TRIS (48 mM)
2,93 g Glycin (39 mM)
3,75 $\mu\text{l}$ 10% SDS
200 ml Methanol

#### *Ponceaufärbung*

Es wurde eine Ponceaufärbung zur Sichtbarmachung der Proteine auf der Nitrocellulosemembran durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine reversible Färbung, da sie mit Wasser wieder zu entfernen ist. Hierzu wird die Nitrocellulose-Membran fünf Minuten in der Färbelösung inkubiert, und danach wieder mit Wasser entfernt.

Tabelle 11: Ponceaulösung

2,5 g	Ponceau
400 ml	Methanol
150 ml	10% Essigsäure
450 ml	ddH <sub>2</sub> O
<b>Lösung filtrieren</b>	



*Immunreaktionen*

Nach dem Blotten schloß sich der immunologische Teil des Western Blots an. Mit Hilfe spezifischer Antikörper können Proteine nachgewiesen werden.

Dafür wurde die Membran über Nacht bei 4°C oder 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 5% BSA (Rinderserumalbumin, „Bovine Serum Albumine“, fettsäurefrei, Sigma) in TBST-Puffer geblockt. Hierdurch versucht man, Membranflächen, die nicht mit Proteinen aus Zellysat besetzt sind, abzublocken, um somit mögliche Hintergrundsignale aufgrund von Bindung mit dem ersten oder zweiten Antikörper zu vermeiden.

*Nachweis Phosphotyrosine*

Nach dem Blocken der Membran, auf die die Proben geblottet worden waren, die mit einem Antikörper gegen ZO-1 immunpräzipitiert worden waren, wurde diese zwei Mal kurz in TBST gewaschen und danach der erste Antikörper Anti-Maus-Phosphotyrosine, No. P3300, Sigma, Verdünnung 1:1000 in TBST + 1% BSA zugegeben. Der Antikörper wurde eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde ein Waschschrift angeschlossen, bei dem zweimal kurz, einmal 15 Minuten und zweimal 5 Minuten mit TBST gewaschen wurde. Danach wurde der zweite Antikörper Anti-Maus-HRP, Verdünnung 1:3500 in TBST + 5% BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur zugesetzt. Im Anschluß daran wurde erneut ein Waschschrift wie oben beschrieben durchgeführt, wobei an diesen noch ein zweimaliger fünfminütiger Waschschrift mit TBS angeschlossen wurde.

*ECL-Detektion*

Die Detektion wurde mit ECL-Kit (Amersham) durchgeführt. Die Methode beruht auf einer enzymatisch katalysierten Lumineszenzreaktion, ausgelöst durch die an den zweiten Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase.

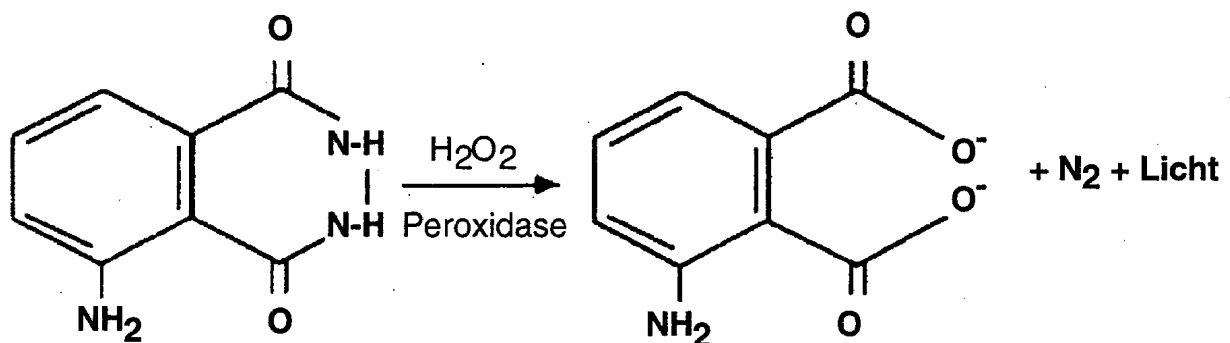


Abb. 7 Chemische Reaktion die durch die „horse radish peroxidase“(HRP) katalysiert wird

Die „horse radish peroxidase“ (HRP) reduziert Hydrogenperoxid (Lösung 1=ECL-Detektionsreagent I) welches daraufhin wiederum Luminol (Lösung 2=ECL-Detektionsreagent II) oxidiert. Luminol produziert bei der Oxidation blaues Licht. Diese Emission wird durch die Gegenwart eines Verstärkers verstärkt und verlängert, so daß sie auf einem Blaulicht-sensitiven-Film festgehalten werden kann.

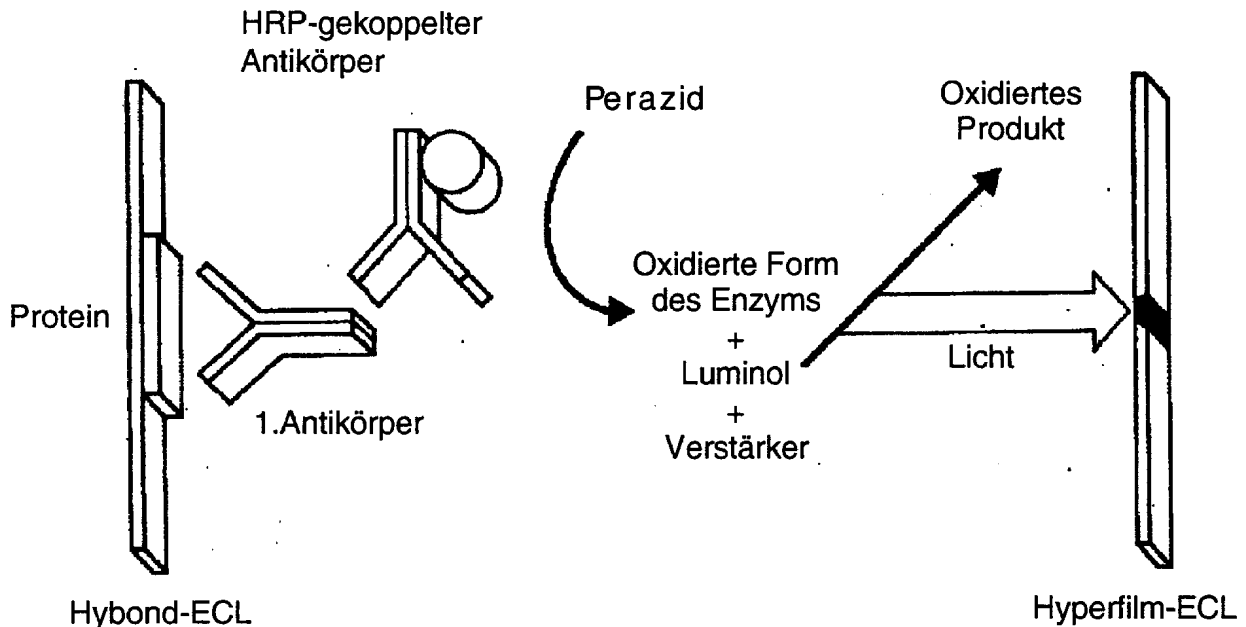


Abb. 8 Prinzip des ECL-Western Blot System (Amersham)

Hierfür wurden die Lösungen eins und zwei im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Nach einer Minute wurde die Lösung wieder entfernt und die Membran luftblasenfrei in Saranwrapfolie eingepackt.

Durch Auflegen eines fluoreszenzempfindlichen Films und anschließender Entwicklung desselben, werden die detektierten Proteine erkennbar.

### Strippen der Membran

Um einen weiteren Antikörpernachweis durchzuführen, besteht die Möglichkeit die Membran zu stripfen. Hierzu gibt man die Membran in Stripping Puffer und inkubiert sie für 30 Minuten bei 50°C. Anschließend wird die Membran zwei Mal je 10 Minuten bei Raumtemperatur in TBST gewaschen. Das TBST sollte man großzügig verwenden. Danach wird die Membran für mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht mit 5% BSA in TBST geblockt. Im Anschluß daran lassen sich weitere Immundetektionen vornehmen

Tabelle 12: Stripping Puffer

100 mM 2 - Mercaptoethanol
2% SDS (Sodiumdodecylsulfat)
62,5 mM TRIS/HCl pH 6,7

*Nachweis ZO-1*

Nach Waschen der Membran in TBST (1x 15 Minuten, 2x 5 Minuten) wurden 3 µl des ersten Antikörpers (Kaninchen-Anti-ZO-1, Polyklonal Antiserum, Zymed No.61 7300) in 3 ml 1% BSA in TBST zugegeben. Die Reaktion des ersten Antikörpers erfolgte ebenfalls über Nacht bei 4°C oder für eine Stunde bei Raumtemperatur. Auf diese Inkubation folgte erneut ein Waschschrift (2x kurz mit TBST, 1x 15 min. mit TBST, 2x 5 min. mit TBST). Durch diesen Waschschrift wurde der nicht gebundene Überschuss des ersten Antikörpers entfernt. Daran schloß sich die Inkubation mit dem zweiten Antikörper Anti-Kaninchen-IgG-HRP (Verdünnung 1:3500 in TBST + 5% BSA, Santa Cruz Biotechnology) für eine Stunde bei Raumtemperatur an. Dieser Antikörper reagiert spezifisch mit dem ersten Antikörper; und zwar bindet dieser an den konstanten Teil von Kaninchenantikörpern – sofern der erste Antikörper aus sensibilisierten Kaninchen stammt. Der zweite Antikörper war mit einer Pferdemeerrettichperoxidase („horse radish peroxidase“ HRP) markiert und erlaubte somit eine Detektion des ersten Antikörpers aufgrund einer enzymatisch katalysierten Lumineszenzreaktion.

Tabelle 13: TBS/TBST

<b>TBS</b>	<b>TBST</b>
10 mM TRIS pH 7,4	10 mM TRIS pH 7,4
150 mM NaCl	150 mM NaCl
	0,1% Tween
Auf 1 Liter Aqua bidest. auffüllen	

Nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde wiederum ein wie oben bereits beschriebener Waschschrift durchgeführt, im Anschluß daran jedoch noch zweimal 5 Minuten mit TBS gewaschen.

*ECL-Detektion*

Die Detektion wurde wie bereits oben beschrieben ebenfalls mit ECL-Kit (Amersham) durchgeführt.



## 3. Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung der verwendeten primären Zellkulturen

#### *Mikrovaskuläre Gehirndothelzellen*

Nach der Isolierung der BMEC (wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben), wurde zunächst eine morphologische und immunhistochemische Charakterisierung der Zellen vorgenommen. Mit Hilfe histologischer Anfärbungen wurden die Zellen hinsichtlich der Aufnahme von LDL und des Vorhandenseins des Von-Willebrand-Faktors und des  $\alpha$ -Aktins glatter Muskelzellen analysiert.

#### *Morphologie*

BMEC wiesen eine spindelförmige Morphologie auf, was auch lichtmikroskopisch deutlich wurde. (Abb. 9). Nach fünf bis siebentägiger Kultivierung bildeten die Zellen einen Monolayer und wuchsen nicht mehrschichtig übereinander.

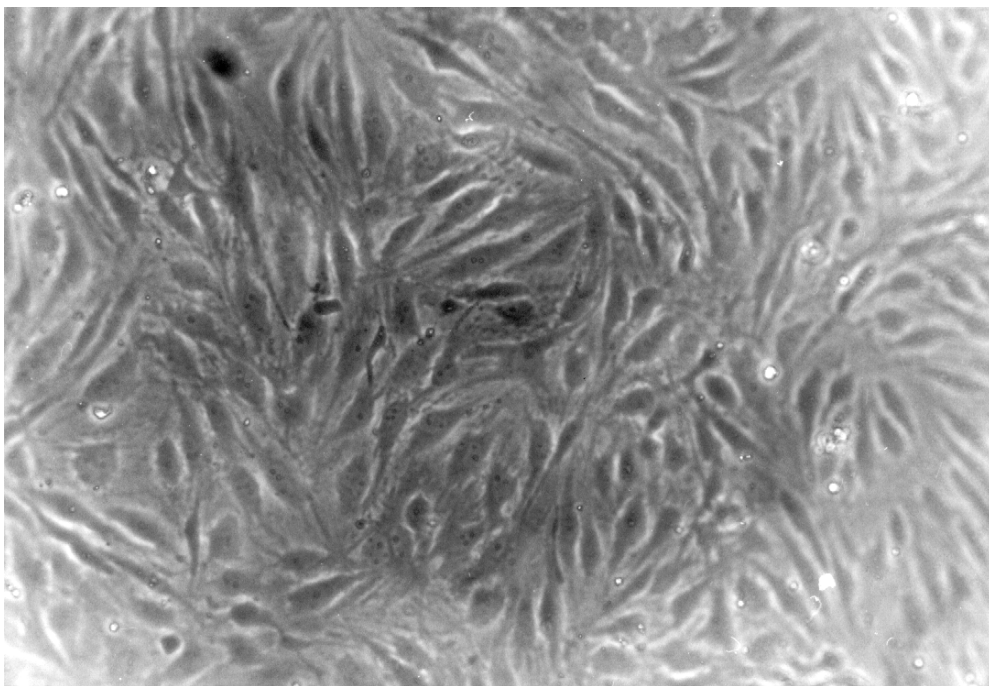


Abb. 9 Morphologie von BMEC. Im konfluenten Stadium zeigen BMEC ein spindelförmiges Wachstumsmuster

### *LDL-Aufnahme*

Die rezeptorvermittelte Endozytose (über sog. „coated vesicles“) und Akkumulation in Endosomen und Lysosomen von fluoreszenzmarkiertem LDL (Dil-Ac-LDL) ist ein Merkmal für Endothelzellen<sup>82</sup>. Der positive Nachweis erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Mit Hilfe eines positiven Nachweises konnte das Vorliegen von Perizyten ausgeschlossen werden, da Perizyten die zur Aufnahme von LDL erforderlichen Rezeptoren fehlen<sup>83</sup>.

Bei LDL handelt es sich um Cholesterin-Protein-Komplexe mit einer relativ geringen Dichte, die die Haupttransportform des Cholesterins im Blut darstellen. Cholesterin als Membranbestandteil stellt einen wesentlichen Baustein der Zelle dar - ein geregelter Cholesterinspiegel in der Zelle ist abhängig von der LDL-Aufnahme.

Die Aufnahme des LDL, das mit 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat markiert war, wurde durch deutliche Fluoreszenzsignale im Zytoplasma der Zelle erkennbar (Abb.10). Ein Vergleich zwischen der DAPI-Kernfärbung und der LDL-Aufnahme zeigte, daß eine Rotfluoreszenz der LDL-Aufnahme einer Zelle zuordbar war. Die Kerne zeigten keine Aufnahme von LDL, was durch die runden Aussparungen im Bereich des Zellkerns zu erkennen war.

Da fast alle Zellen eine LDL -Aufnahme zeigten, handelt es sich um ziemlich reine Endothelzellkulturen, die nur einen sehr geringen Anteil an Perizyten enthalten.

### *Von-Willebrand-Faktor*

Weiterhin wurde zur Charakterisierung der Endothelzellen das Vorhandensein des Von-Willebrand-Faktor untersucht. Der Von-Willebrand-Faktor ist ein Kofaktor der plasmatischen Blutgerinnung, der für die Adhäsion von Blutplättchen am Gefäßendothel von Bedeutung ist. Endothelzellen produzieren den Faktor und speichern ihn in den sogenannten Weibel-Pallade-Körperchen. Dabei handelt es sich um Vesikel, die verschiedene Komponenten speichern und ihren Inhalt bei Bedarf ausschütten. Die Abb. 11 zeigt deutliche punktförmige Immunfluoreszenzsignale im Zytoplasma der Zellen. Aufgrund der Propidiumjodidfärbung war fast jeder Zelle eine positive Fluoreszenzreaktion zuzuordnen. Das Vorhandensein von Weibel-Pallade-Körperchen in nahezu jeder Zelle spricht für eine relativ reine Kultur.

In den Kontroll-Zellen, die ohne ersten Antikörper behandelt wurden, war keine Grünfluoreszenz der angefärbten Weibel-Palade-Körperchen nachweisbar. Dies schließt eine Kreuzreaktion der Zellen mit dem zweiten und dritten Antikörper aus.

*„ $\alpha$ -smooth-muscle-actin“*

Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit anti- $\alpha$ -smooth-muscle-Aktin inkubiert, um Kontaminationen der Kultur mit Perizyten oder anderen Zellen auszuschließen.

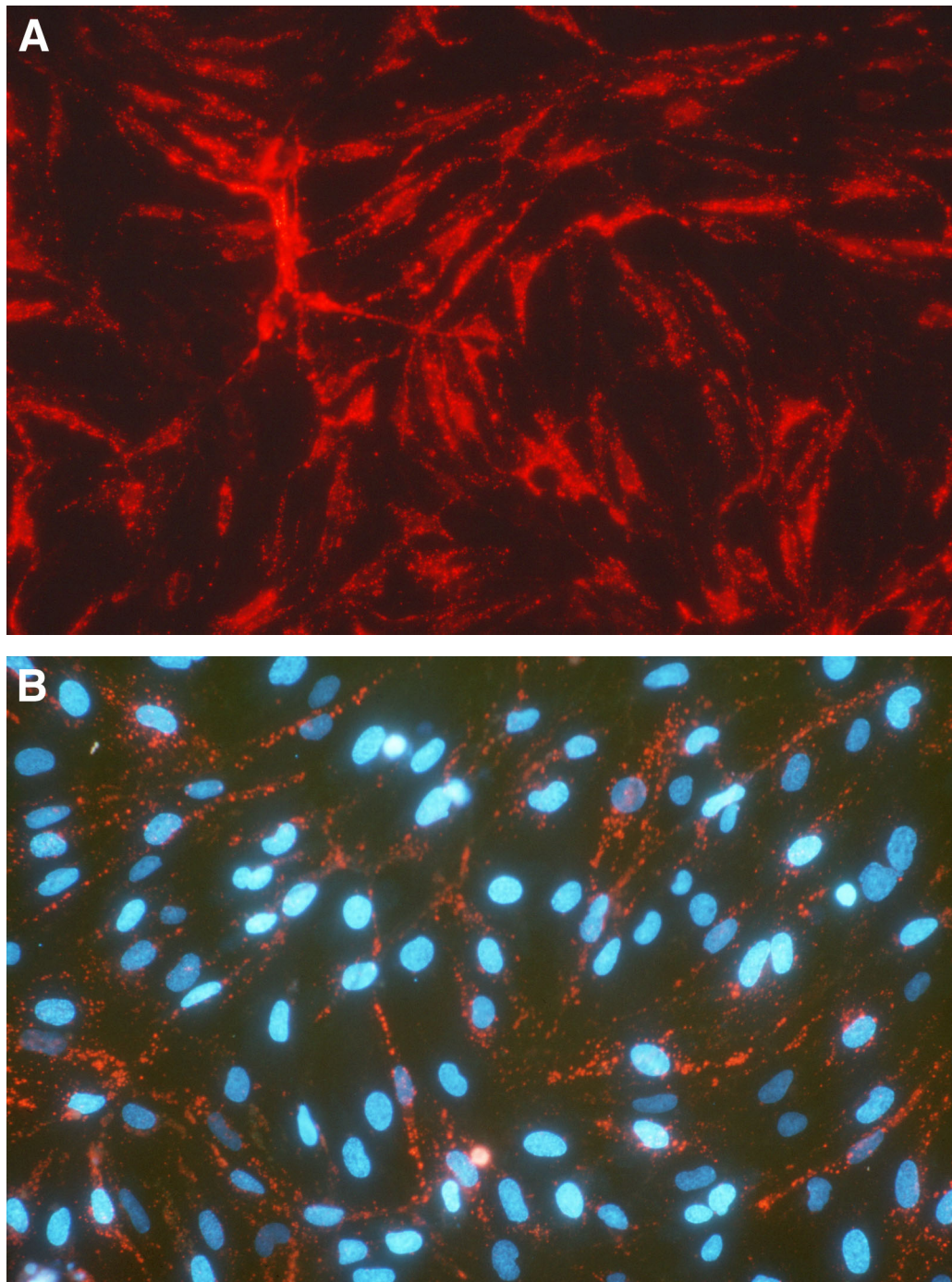
Aktin ist ein weit verbreitetes Protein, das Aktin-Filamente in allen Eukaryontenzellen bildet. Der gegen das  $\alpha$ -Aktin der glatten Muskelzellen gerichtete Antikörper reagiert mit der Isoform des Aktins, die in Perizyten und glatten Muskelzellen vorhanden ist. Es findet keine Reaktion mit dem Aktin der Endothelzellen statt. Die immunhistologische Anfärbung der Zellen zeigte, daß nur ein geringer Anteil (deutlich unter 5%) der BMEC-Kultur  $\alpha$ -Aktin-positiv war (Abb. 12). Durch die Kernfärbung war erkennbar, daß der Großteil der Zellen keine grüne Fluoreszenz der  $\alpha$ -Aktin-Färbung aufwies, was die Reinheit der Endothelzellkultur bestätigte.

*Nachweis von Astrozyten**GFAP-Test*

Bei GFAP („glial fibrillary acidic protein“) handelt es sich um ein Protein differenzierter Astrozyten. In unserem Fall zeigte die GFAP-Färbung eine positive Reaktion und bestätigte somit das Vorliegen einer reinen Astrozytenpopulation (Abb. 13). Wie auch bei der Von-Willebrand-Faktor-Färbung zeigten alle Zellen ein grünes Fluoreszenzsignal des zweiten Antikörpers.

Die Kontrollversuche ohne ersten Antikörper zeigten, daß keine Kreuzreaktion der Zellen mit dem zweiten und dritten Antikörper stattfand, da lediglich die Fluoreszenzsignale der Propidiumjodidfärbung zu erkennen waren.

Sowohl die Morphologie als auch die immunhistologischen Anfärbungen bestätigten das Vorliegen einer weitgehend reinen Endothelzellkultur.

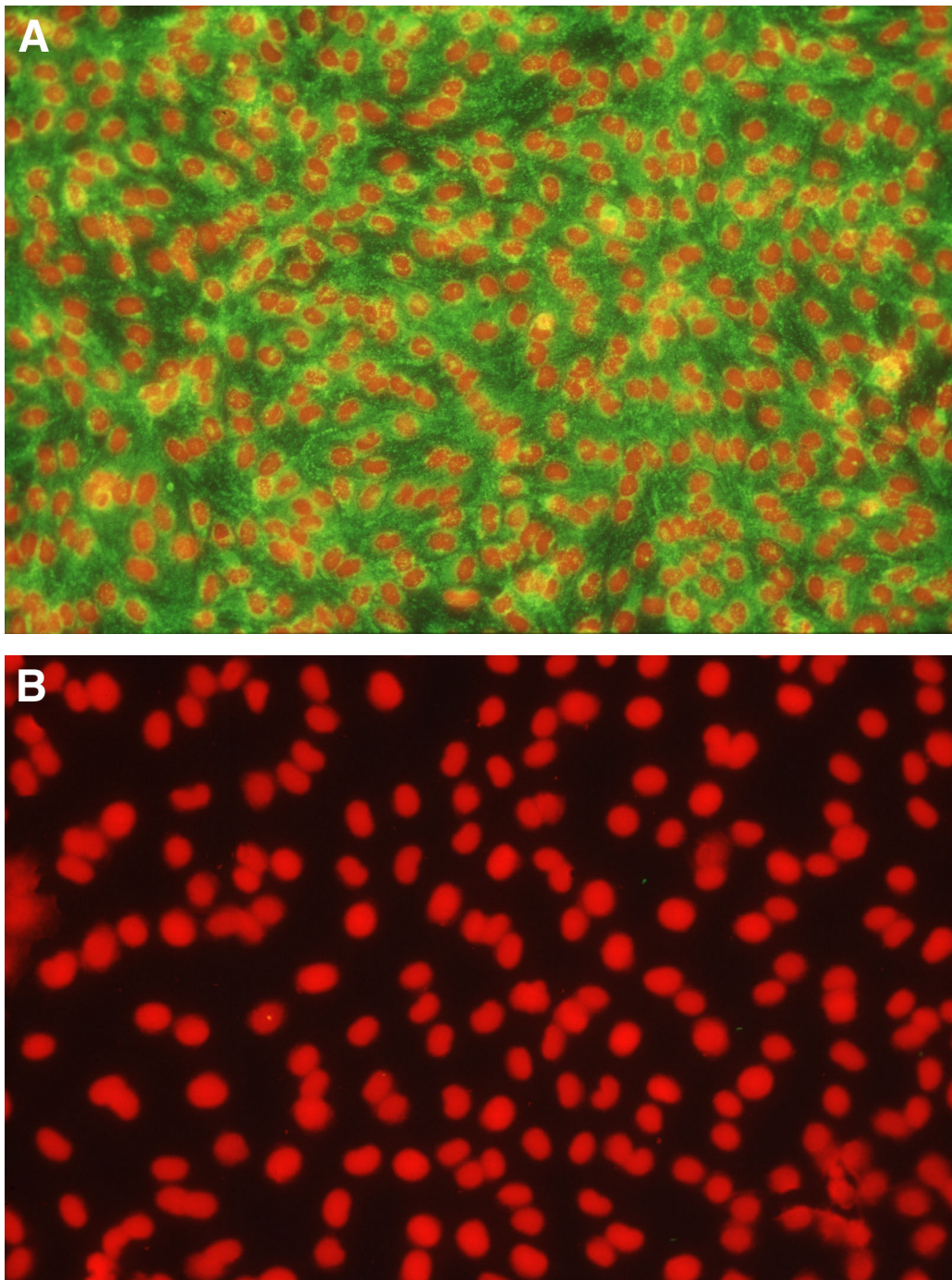


*Abb. 10 LDL*

*A: Aufnahme von 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-Carbocyanin Perchlorat markiertem LDL in BMEC*

*B: Kernfärbung mit DAPI*





*Abb. 11 Von-Willebrand-Faktor*

*A: Immunhistologische Färbung der BMEC mit in Kaninchen entwickeltem gegen humanen Von-Willebrand-Faktor gerichteten ersten Antikörper. Die Fluoreszenzintensität des eingesetzten zweiten Antikörpers „biotin-SP-conjugated Affinity Pure Donkey anti-rabbit IgG“ wurde durch den dritten Antikörper „Cy<sup>2</sup> conjugated Streptavidin“ verstärkt. Es wurde eine Kernfärbung mit Propidiumjodid durchgeführt.*

*B: Kontrollkulturen. Zellen, die lediglich mit dem zweiten und dritten Antikörper behandelt wurden. Es wurde ebenfalls eine Kernfärbung mit Propidiumjodid durchgeführt.*

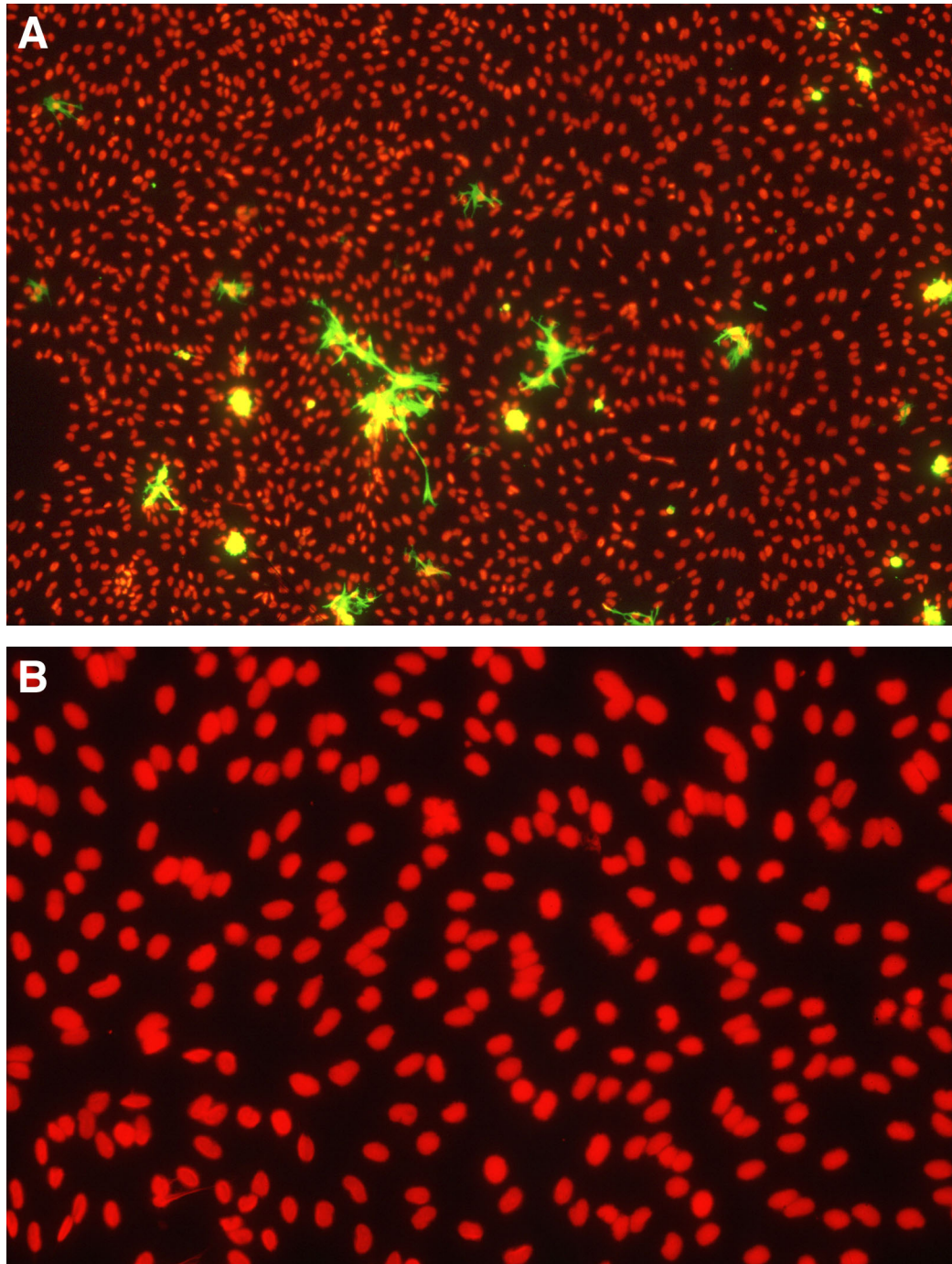


Abb. 12: „ $\alpha$ -smooth muscle actin“

**A:** Immunhistologische Färbung der BMEC mit in Mäusen entwickeltem gegen „ $\alpha$ -smooth muscle actin“ gerichteten ersten Antikörper. Die Fluoreszenzintensität des eingesetzten zweiten Antikörpers „biotin-SP-conjugated Affinity Pure Donkey anti-mouse IgG“ wurde durch den dritten Antikörper „cy<sup>2</sup> conjugated Streptavidin“ verstärkt. Es wurde eine Kernfärbung mit Propidiumjodid durchgeführt.

**B:** Kontrollkulturen. Zellen, die lediglich mit dem zweiten und dritten Antikörper behandelt wurden. Es wurde ebenfalls eine Kernfärbung mit Propidiumjodid durchgeführt.



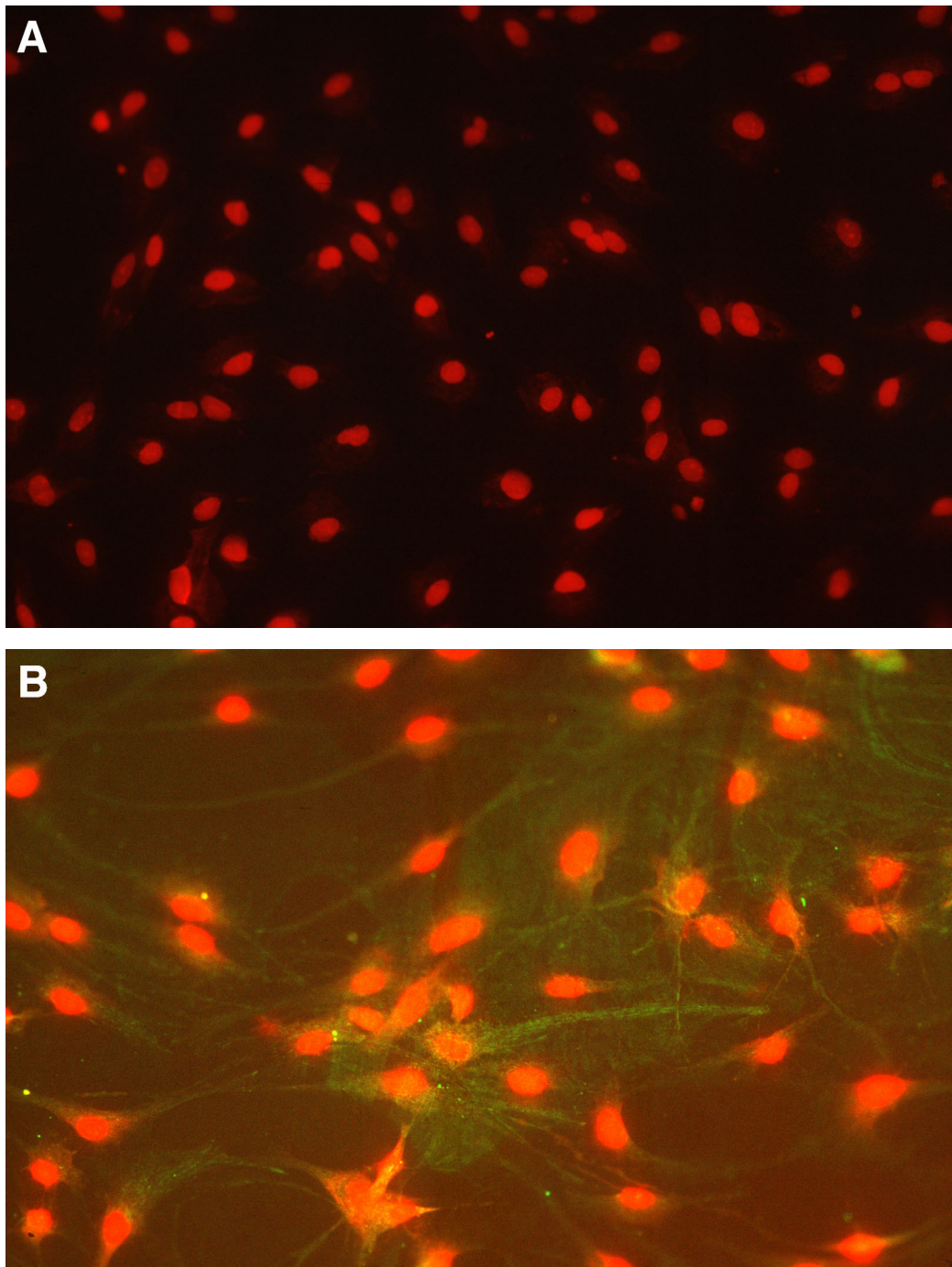


Abb. 13 GFAP

**A:** Immunhistologische Anfärbung der Astrozyten mit in Kaninchen entwickeltem gegen GFAP gerichteten ersten Antikörper. Die Fluoreszenzintensität des eingesetzten zweiten Antikörpers „biotin-SP-conjugated Affinity Pure Donkey anti-rabbit IgG“ wurde durch den dritten Antikörper „cy<sup>2</sup> conjugated Streptavidin“ verstärkt. Es wurde eine Kernfärbung mit Propidiumjodid durchgeführt.

**B:** Kontrollkulturen. Zellen, die lediglich mit dem zweiten und dritten Antikörper behandelt wurden. Es wurde ebenfalls eine Kernfärbung mit Propidiumjodid durchgeführt.

### 3.2. Wirkung von Hypoxie auf Permeabilitätseigenschaften des BMEC-Monolayers

Da für die nachfolgenden Versuche die Zellen bis zu 24 Stunden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, sollte mit Hilfe eines Zytotoxizitätstests überprüft werden inwieweit die Zahl der lebenden Zellen, die proportional dem DNA-Gehalt der Zellen ist, unter hypoxischen Bedingungen gegenüber normoxischen Bedingungen verändert wird.

#### *Zytotoxizitätstest*

Hierzu wurden die Zellen wie unter 2.1.1 beschrieben ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Medium ohne und mit FCS wurde den Zellen zugegeben und diese dann für 6 und 24 Stunden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen inkubiert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Zellzahl zwischen Normoxie oder Hypoxie. Die Gegenwart von FCS hatte keinen signifikant nachweisbaren Einfluß die Anzahl der lebenden Zellen, bzw. auf die Anzahl der Zellen in der Kultur nach Ablauf von 24 Stunden, was darauf zurückzuführen ist, daß die Zellen bereits konfluent waren:

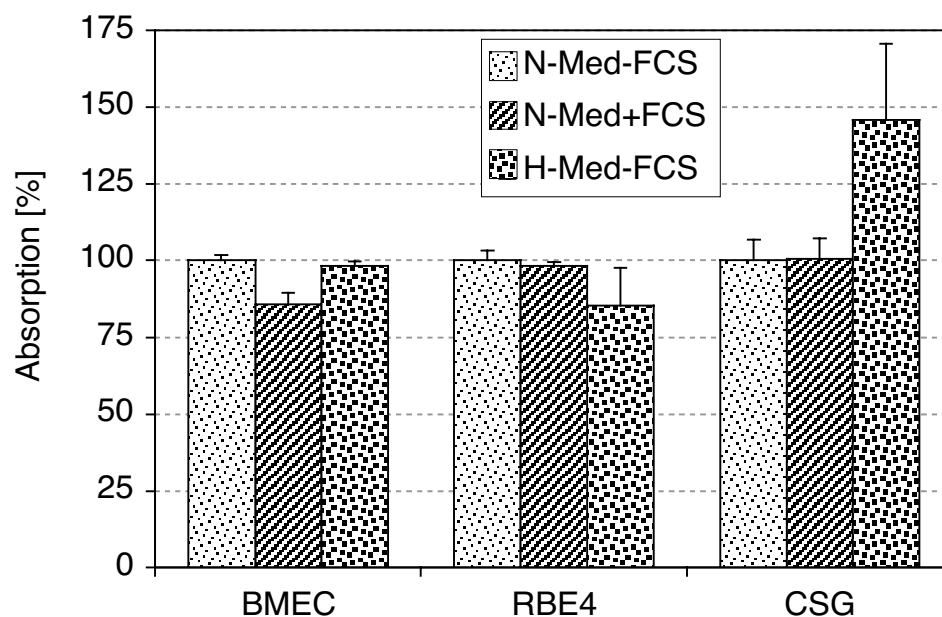


Abb. 14 Zytotoxizitätstest von BMEC, RBE4 und CSG nach 6stündiger Normoxie und Hypoxie.. Die Zellen wurden entweder unter normoxischen Bedingungen 6h in Medium 199 ohne FCS (N-Med.-FCS), mit FCS (N-Med.+FCS) oder 6h unter hypoxischen Bedingungen in Medium ohne FCS (H-Med.-FCS) kultiviert. Anschließend wurde die Anzahl der lebenden Zellen mittels eines nicht radioaktiven Kits bestimmt. Die Anzahl der lebenden Zellen, die nach 6stündiger Normoxie in Kontrollkulturen, d.h. in solchen, die in Normoxie in M199 ohne FCS kultiviert wurden, bestimmt wurde, wurde gleich 100% gesetzt. Die einzelnen Werte entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  SEM (n=4).

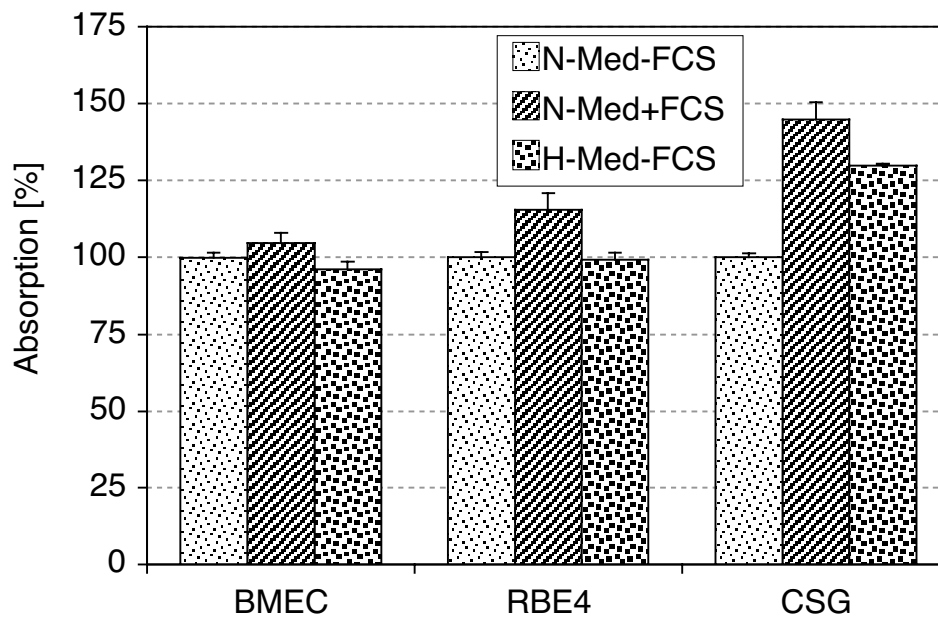


Abb. 15 Zytotoxizitätstest von BMEC, RBE4 und CSG nach 24 stündiger Normoxie und Hypoxie. Die Zellen wurden entweder unter normoxischen Bedingungen in Medium M199 ohne FCS (N-Med.-FCS), mit FCS (N-Med.+FCS) oder 24 Stunden unter hypoxischen Bedingungen in Medium ohne FCS (H-Med.-FCS) kultiviert. Anschließend wurde die Anzahl der lebenden Zellen mittels eines nicht radioaktiven Kits bestimmt. Die Anzahl der lebenden Zellen, die nach 24 stündiger Normoxie in Kontrollkulturen, d.h. in solchen, die in Normoxie in M199 ohne FCS kultiviert wurden, bestimmt wurde, wurde gleich 100% gesetzt. Die einzelnen Werte entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  SEM ( $n=4$ ).

Da die Viabilität der Zellen auch nach 24 stündiger Hypoxie gegenüber der nach 24 stündiger Normoxie bestimmten, keine signifikanten Veränderungen zeigte, wurden die isolierten Hirnendothelzellen nun dazu verwendet, den Einfluß von Hypoxie auf die Permeabilität des Endothelzellmonolayers zu untersuchen.

Dazu wurde ein in vitro Modell verwendet, wobei die Endothelzellen auf Polycarbonatfiltern (Millipore) ausgesät und für mindestens vier Tage bei 37°C im Brutschrank kultiviert wurden. Die Innenseite der Filter entspricht der luminalen Seite der Hirnkapillaren, die Außenseite der abluminalen Seite.

#### Messung der Ionenpermeabilität

Um eine Aussage über die Qualität der Endothelzellmonolayer auf den Filtern machen zu können, wurden ab dem dritten Tag der Kultivierungen Widerstandsmessungen mit Hilfe von zwei Elektroden, die zeitgleich einmal in den Filter und in das diesen umgebende Medium eingetaucht wurden, gemessen. Bei diesen Widerstandsmessungen handelt es sich im wesentlichen um eine Messung der Ionenpermeabilität der Endothelzellmonolayer. BMEC-Kulturen, die Widerstände von mehr als  $100 \Omega\text{cm}^2$  aufwiesen, wurden für die Permeabilitätsversuche verwendet.

### *Passage von Evans-blue-Albumin (EBA)*

Da es zwei mögliche Wege im Endothelzellmonolayer gibt, durch die eine Passage durch den Endothelzellmonolayer möglich ist, wurden für den Nachweis zwei verschiedene Tracer verwandt:

Evansblue-markiertes Albumin, das vorwiegend über einen transzytotischen Mechanismus den Endothelzellmonolayer passiert.

Tritium-markiertes Inulin ( $[^3\text{H}]$  - Inulin), das die Monolayer auf parazellulärem Wege passiert.

### *Zeitabhängigkeit der Passage von EBA und Inulin durch den Endothelzellmonolayer*

Den Filtern wurde vor Versuchsbeginn von der Seite, die der luminalen Seite der Kapillaren entspricht, Evansblue-Albumin oder Tritium-markiertes Inulin zugesetzt.

Daraufhin wurden die Endothelzellmonolayer für jeweils 1,5, 3 und 6 Stunden unter hypoxischen Bedingungen inkubiert.

Als Kontrolle dienten Zellen, die für die entsprechenden Zeiten unter normoxischen Bedingungen inkubiert wurden.

Zur Bestimmung der Tracer-Konzentration, die den Endothelzellmonolayer nach Ablauf der Inkubationszeit passiert hatte, wurden Aliquots aus der abluminalen Seite entnommen. Die Konzentration des Evans-Blue-Albumins wurde photometrisch bestimmt und die des  $[^3\text{H}]$  Inulin anhand der gemessenen cpm-Werte wie unter „Material und Methoden“ beschrieben.

Aus Abb. 16 und 17 wird erkennbar, daß die Permeabilität unter normoxischen Bedingungen eine lineare Zeitabhängigkeit aufwies. Hypoxie von mehr als zwei Stunden bewirkte einen signifikanten Permeabilitätsanstieg.

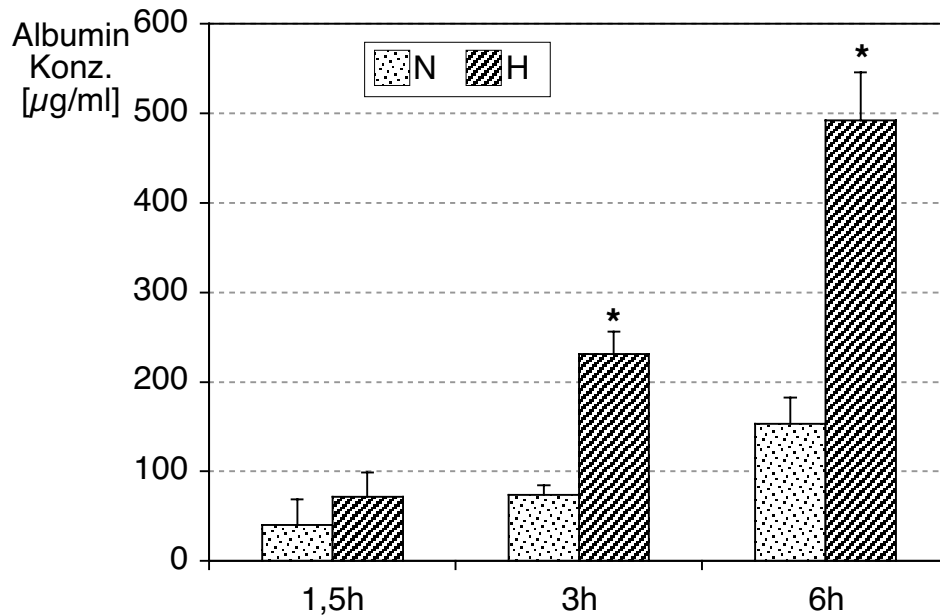


Abb. 16 Zeitabhängigkeit der Passage von EBA durch den BMEC-Monolayer. Die Zellen wurden 1,5, 3 und 6 Stunden unter normoxischen Bedingungen (N) oder hypoxischen Bedingungen (H) inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration des EBA, das den Monolayer passiert hatte, bestimmt. Die einzelnen Werte entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  SEM ( $n=10$ , \*:  $p<0,05$ , bezüglich des nach entsprechenden Inkubationszeiten unter normoxischen Bedingungen bestimmten Wertes).

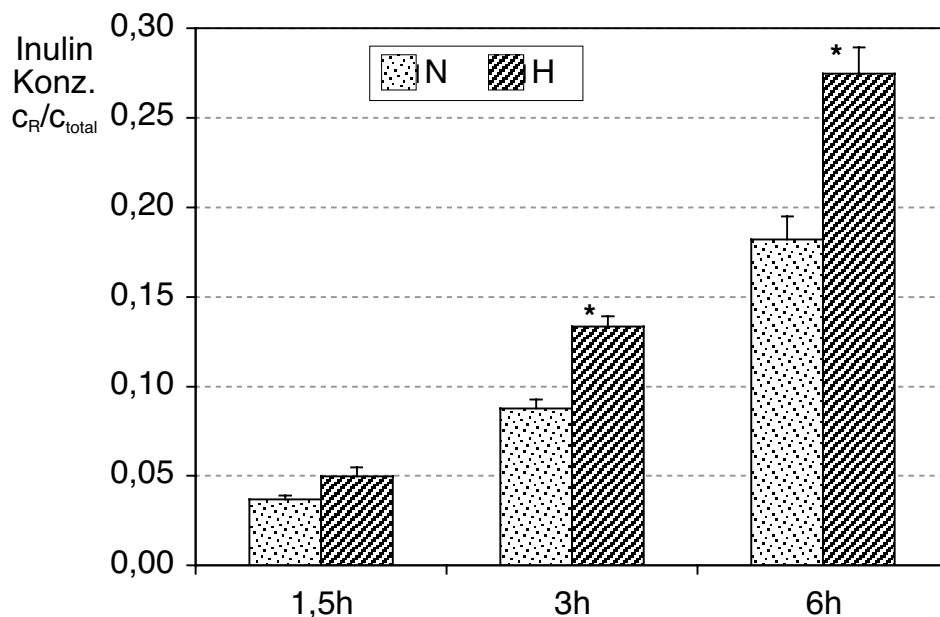


Abb. 17 Zeitabhängigkeit der Passage von Inulin durch den BMEC-Monolayer. Die Zellen wurden 1,5, 3 und 6 Stunden unter normoxischen Bedingungen (N), oder hypoxischen Bedingungen (H) inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration des Inulin, das den Monolayer passiert hat, bestimmt. Die Ergebnisse wurden ausgedrückt als Quotient aus der Konzentration, die nach bestimmten Inkubationszeiten im äußeren Kompartiment bestimmt wurde und derjenigen, die zu Versuchsbeginn der luminalen Seite zugegeben wurde ( $c_R/c_{total}$ ). Die einzelnen Werte entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  SEM ( $n=10$ ; \*:  $p<0,05$ , bezüglich des nach entsprechenden Inkubationszeiten unter normoxischen Bedingungen bestimmten Wertes).

### *Mechanismus der Passage des EBA über den BMEC-Monolayer*

Da der Hypoxieeffekt auf die Permeabilität des Endothelzellmonolayers gegenüber EBA und Inulin denselben zeitlichen Verlauf zeigte, sollte überprüft werden, ob EBA in unserem Modell mittels des transzellulären oder parazellulären Weges den Endothelzellmonolayer passiert. Dazu sollte der transzelluläre Weg mittels N-ethylmaleimide (NEM) gehemmt werden.

Der Wirkungsmechanismus des NEM beruht im wesentlichen auf einer Hemmung der rezeptorvermittelten Endozytose. Spezielle Oberflächenproteine der Endothelzellen interagieren hierbei mit zirkulierenden Makromolekülen im Blut, wie beispielsweise Transferrin, Insulin, Albumin, etc.<sup>84</sup>. Es wurde gezeigt, daß der Transport des Albumins über das Endothel in Abhängigkeit von Interaktionen mit dem endothelialen Oberflächenprotein Albondin erfolgt<sup>85</sup>. Modifizierte Albumine reagieren mit zwei weiteren Oberflächenproteinen gp30 und gp18<sup>86</sup>. Albondin wurde außerdem in Caveolae nachgewiesen, was darauf hindeutet, daß Caveolae eng mit dem Transport des Albumins assoziiert sind.

Viele membranöse vesikuläre Transportsysteme können durch das thioalkylierende Agens N-ethylmaleimide (NEM) gehemmt werden, wie z. B. die Aufnahme von Transferrin und seine Abgabe in Retikulozyten<sup>87</sup>, die Transcytose von Clathrinumhüllten Vesikeln des polymerischen Immunglobulin-A-Rezeptors<sup>88</sup>, sowie der Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat, innerhalb des Golgi-Apparates und von Endosomen zum Golgi-Apparat<sup>89</sup>.

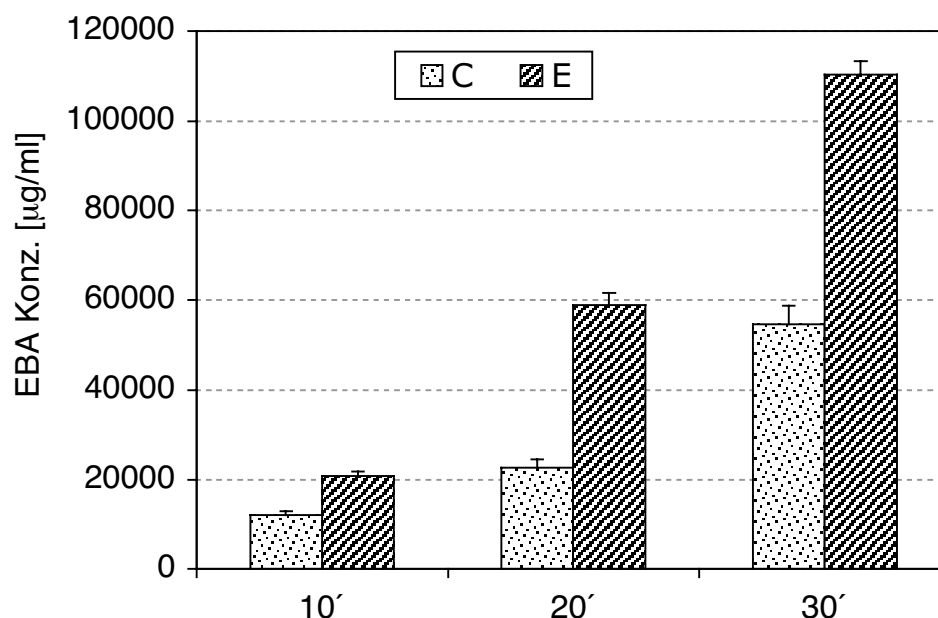


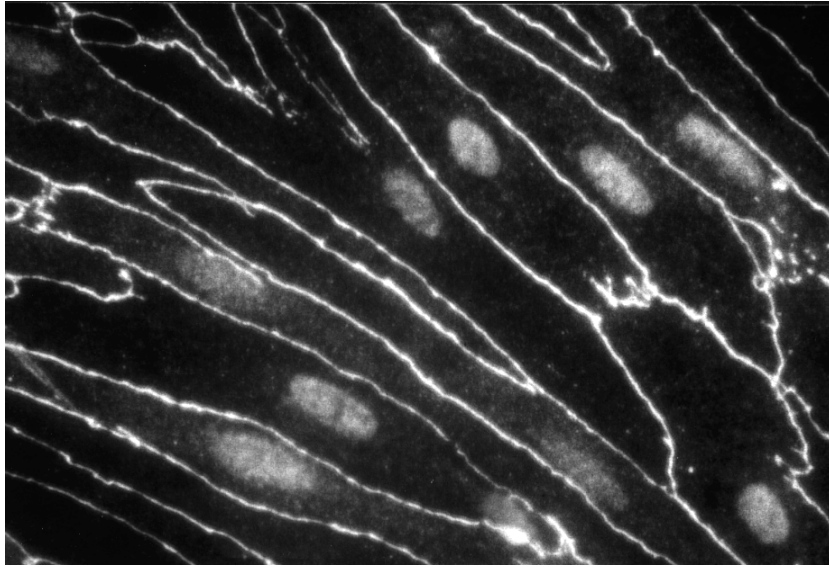
Abb. 18 Passage von EBA über den Endothelzellmonolayer nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit NEM. 0,3 mM NEM wurde zu Beginn des Versuches zugegeben. Nach 10, 20 und 30' wurde die Konzentration des EBA in Kontrollkulturen (C) und NEM behandelten Kulturen (E) bestimmt. Die einzelnen Werte entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  SEM ( $n=10$ ,  $^*p<0.05$ , bezüglich des nach entsprechenden Inkubationszeiten unter normoxischen Bedingungen bestimmten Wertes).



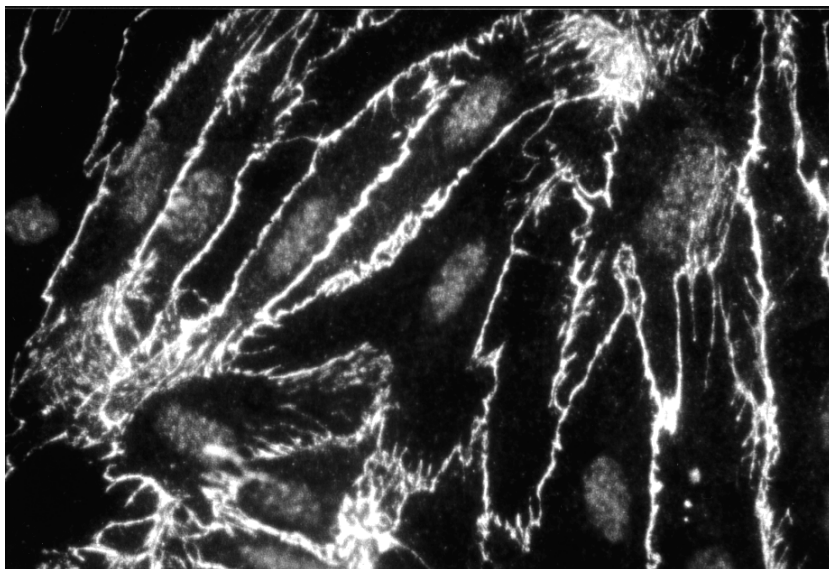
Die Zugabe von NEM bewirkte bei einer Inkubationszeit von bis zu 10 Minuten keine signifikanten Permeabilitätsveränderungen des Endothelzellmonolayers gegenüber EBA. Das spricht dafür, daß EBA in unserem Modell den Endothelzellmonolayer parazellulär passiert, da NEM den parazellulären Weg nicht verändert, wie von Schnitzer et al.<sup>84</sup> beschrieben wurde. Der nach längeren Inkubationszeiten mit NEM zu beobachtende Permeabilitätsanstieg ist durch eine Schädigung der Membran durch NEM erklärbar wie von Schnitzer et al. gezeigt wurde<sup>90</sup>.

### **3.3. Wirkung von Hypoxie auf die Expression des Zonula occludens-Protein-1 (ZO-1)**

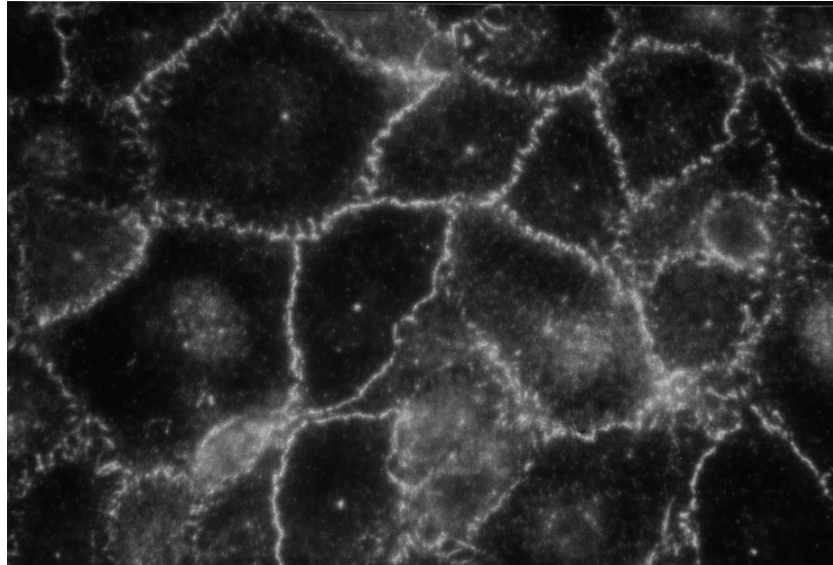
Nachdem in den vorangegangenen Versuchen festgestellt worden war, daß Hypoxie die Passage parazellulärer Tracer beschleunigt, sollte im folgenden mit Hilfe immunhistochemischer Methoden untersucht werden, ob Veränderungen der Tight Junctions hinsichtlich der Proteinexpression damit korrelierten. Zonula occludens-1-Protein (ZO-1) wurde als Marker verwendet, da es sich hierbei um eines der Proteine der Tight Junction handelt. Nach 24 stündiger Inkubation unter hypoxischen Bedingungen ließ sich eine veränderte Lokalisation der ZO-1 Expression nachweisen. Sichtbar wurden sogenannte Gapbildungen, und eine Dissoziation der Kontinuität des vorher die Zellmembran umgebenden Tight-Junction-Verbandes. Diese Veränderungen wurden sowohl bei BMEC-Kulturen, wie auch bei RBE4- und CSG-Kulturen beobachtet. RBE4- und CSG-Kulturen stellten Kontrollgruppen dar: RBE4 als Endothelzelllinie aus Rattengehirn und CSG als Epithelzelllinie aus Submandibularkarzinomzellen. Von allen drei Zellarten ist die Ausbildung von Tight Junctions bekannt. Es muß hinzugefügt werden, daß die Ausbildung der Tight Junctions bei RBE4-Zellen in geringerem Maße oder insuffizienter als bei BMEC und CSG Zelllinien erfolgt. Dies äußert sich zum einen in der Messung geringerer Widerstände, wie auch in der Literatur beschrieben, zum anderen korrelieren diese Voraussetzungen mit den hier dargelegten Ergebnissen, da die immunhistochemischen Anfärbungen der Zellmembranen der RBE4-Zellen nicht so homogen ausgeprägt sind wie vergleichsweise bei den BMEC und CSG-Zellen.



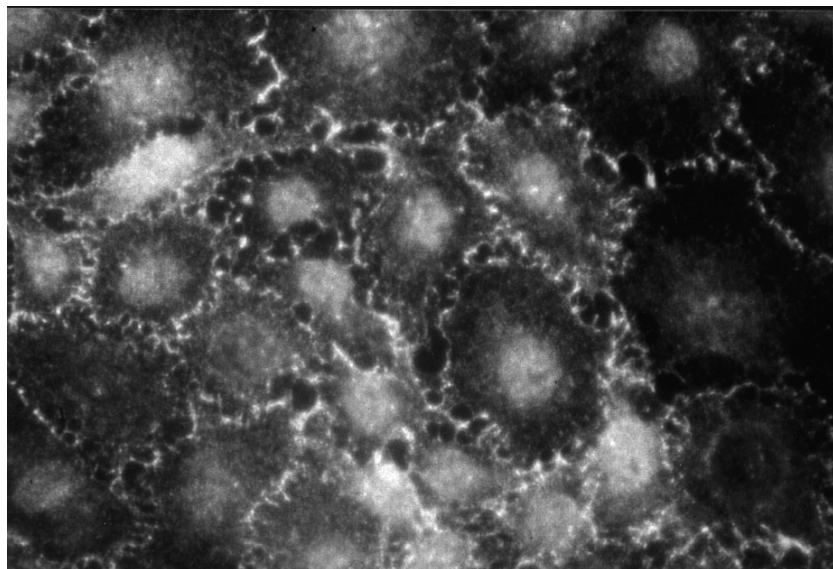
*Abb. 19 ZO-1 Expression in BMEC nach 24 stündiger Normoxie. Konfluente BMEC-Kulturen wurden 24h unter normoxischen Bedingungen in M199-FCS inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht. (1 cm = 13  $\mu$ m)*



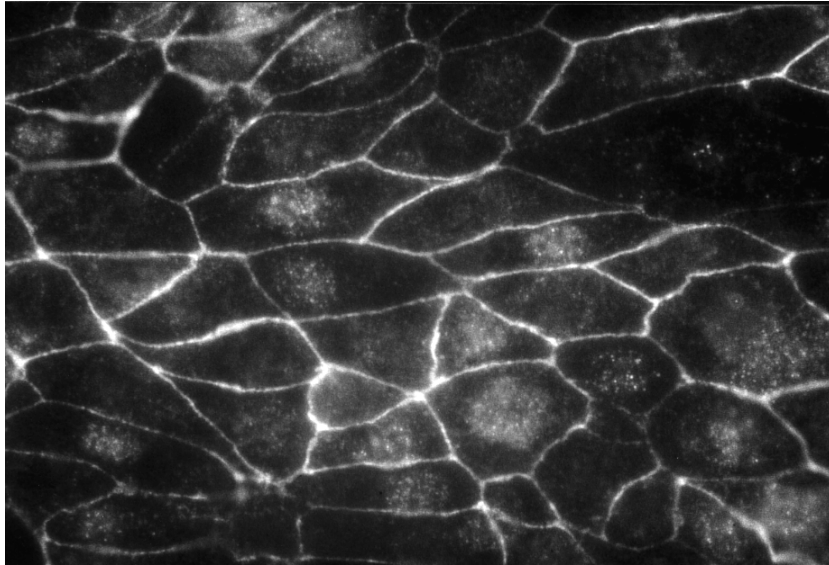
*Abb.20 ZO-1 Expression in BMEC nach 24 stündiger Hypoxie. Konfluente BMEC Kulturen wurden 24h unter hypoxischen Bedingungen in M199-FCS inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht (1 cm=13  $\mu$ m).*



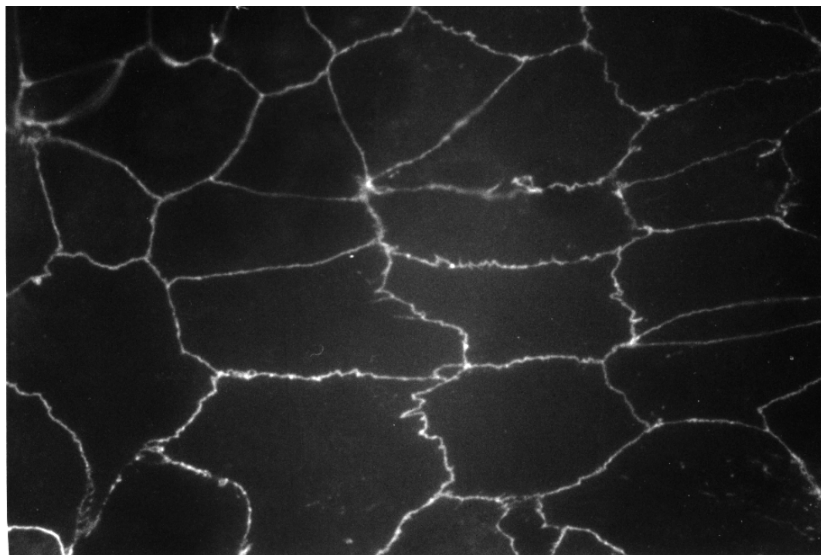
*Abb.21 ZO-1 Expression in RBE4-Zellen nach 24 stündiger Normoxie. Konfluente RBE4-Kulturen wurden 24h unter normoxischen Bedingungen in M199-FCS inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht (1 cm =13  $\mu$ m).*



*Abb. 22 ZO-1 Expression in RBE4-Zellen nach 24 stündiger Hypoxie. Konfluente RBE4 Kulturen wurden 24h unter hypoxischen Bedingungen in M199-FCS inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht (1 cm =13  $\mu$ m).*



*Abb. 23 ZO-1 Expression in CSG-Zellen nach 24 stündiger Normoxie. Konfluente CSG Kulturen wurden 24 h unter normoxischen Bedingungen in M199-FCS inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht (1cm =80µm).*

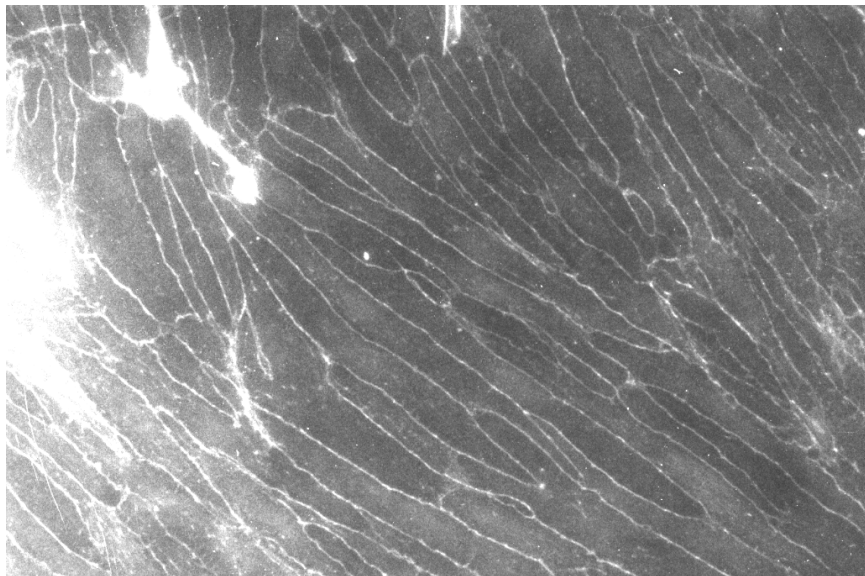


*Abb. 24 ZO-1 Expression in CSG-Zellen nach 24 stündiger Hypoxie. Konfluente CSG Kulturen wurden 24h unter hypoxischen Bedingungen in M199-FCS inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht (1 cm =80 µm).*

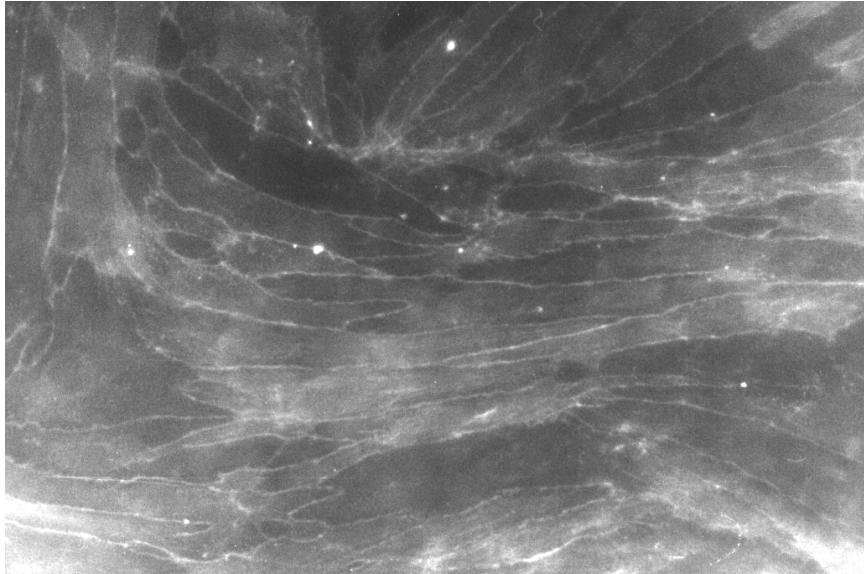
### 3.4. Wirkung von Hypoxie auf die F-Aktin-Expression

#### *Immunhistochemischer Nachweis*

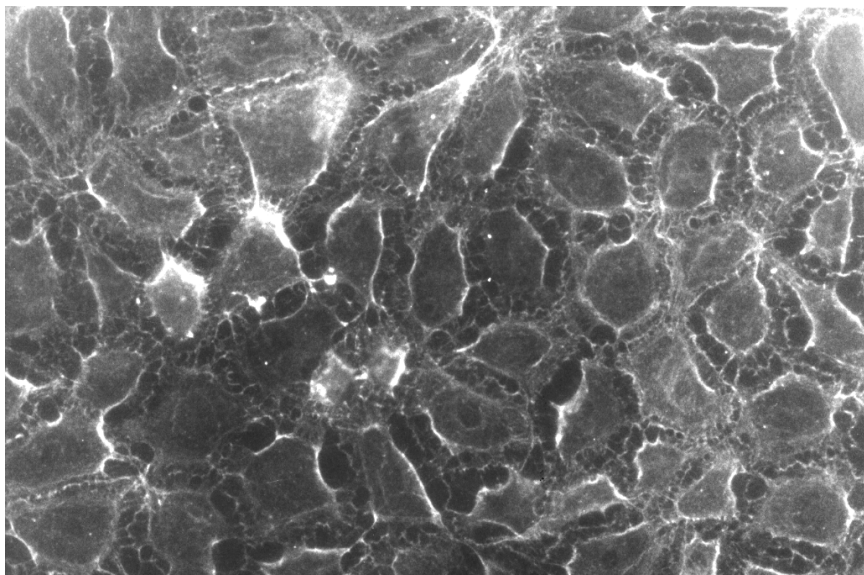
Um festzustellen, ob auch zytoskeletale Bestandteile der Zelle an den parazellulären Membranveränderungen bei Hypoxie beteiligt waren, wurde die Expression von F-Aktin mit immunhistochemischen Methoden untersucht. Dieses Protein ist Bestandteil des Cytoskeletts und eng mit den Komponenten der Tight Junction assoziiert, besonders mit ZO-1<sup>91,92</sup>. Durch Hypoxie könnte es zu einer Umorganisation des Cytoskeletts mit daraus resultierenden Umstrukturierungen der Zellmorphologie und des Zellphänotyps kommen, was sich dann in einer veränderten oder mangelnden Ausprägung der Tight Junctions äußern könnte. Hierzu wurden wiederum BMEC-, RBE4- und CSG- Zellen bis zur Konfluenz kultiviert und 24 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Tetramethylrhodamin-5-(-6-)isothiocyanat (TRITC-) konjugiertem Phalloidin, einem Fluoreszenzfarbstoff für F-Aktin, angefärbt.



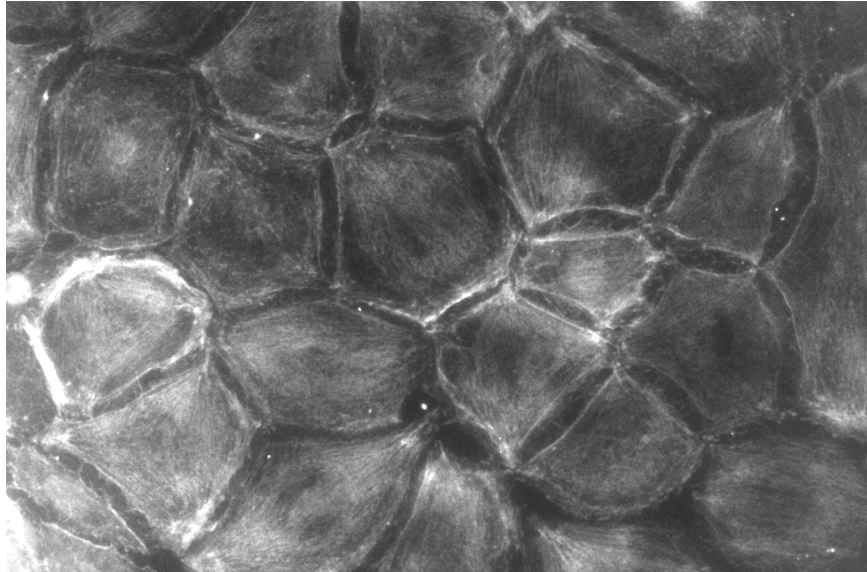
*Abb. 25 F-Aktin Expression in BMEC nach 24 stündiger Normoxie. Konfluente BMEC Kulturen wurden 24h unter normoxischen Bedingungen in M199-FCS inkubiert. Anschließend wurde die Expression des F-Aktins mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht. (1 cm=13 µm). Eine mehr an den Zellmembranen lokalisierte Verteilung des F-Aktins wird deutlich.*



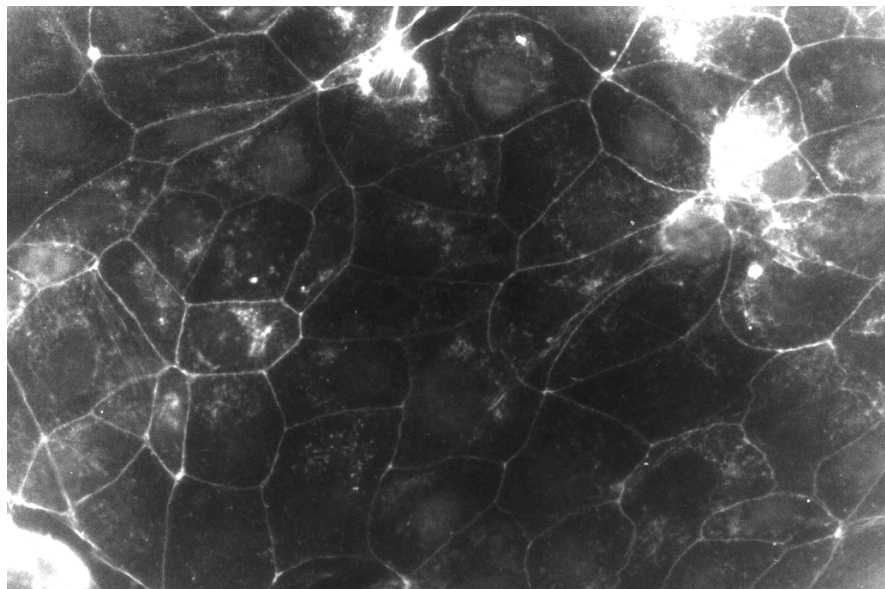
*Abb. 26 F-Aktin Expression in BMEC nach 24 stündiger Hypoxie. Konfluente BMEC Kulturen wurden 24h unter hypoxischen Bedingungen in M199-FCS inkubiert. Anschließend wurde die Expression des F-Aktins mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht. F-Aktin findet sich nicht mehr so deutlich an den Membranen lokalisiert. (1 cm=13  $\mu$ m). Eine leichte Stressfaserbildung könnte angedeutet sein.*



*Abb. 27 F-Aktin Expression in RBE4-Zellen nach 24 stündiger Normoxie. Konfluente RBE4 Kulturen wurden 24h unter normoxischen Bedingungen in M199-FCS inkubiert. Anschließend wurde die Expression des F-Aktins mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht. (1 cm=80  $\mu$ m). Eine mehr an den Zellmembranen lokalisierte Verteilung des F-Aktins wird deutlich.*

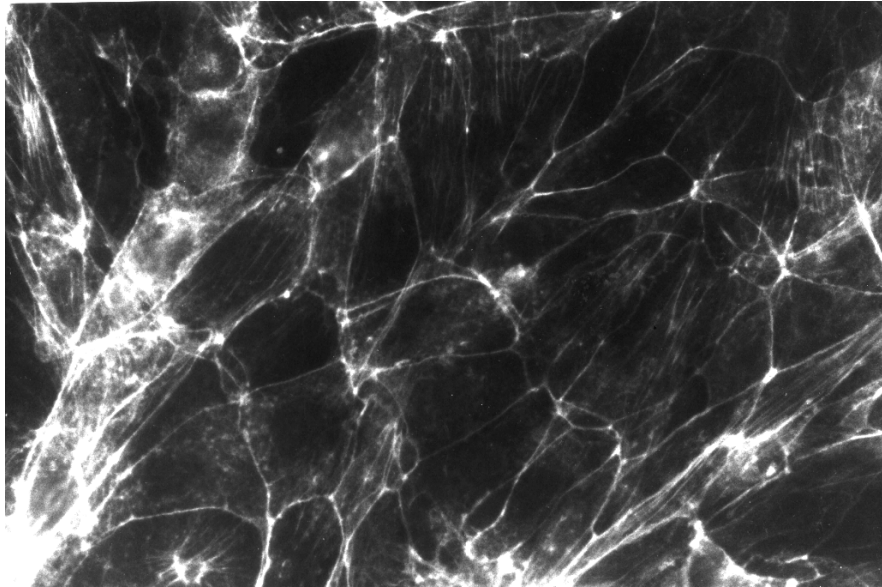


*Abb. 28 F-Aktin Expression in RBE4-Zellen nach 24 stündiger Hypoxie. Konfluente RBE4 Kulturen wurden 24h unter hypoxischen Bedingungen in M199-FCS inkubiert. Anschließend wurde die Expression des F-Aktins mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht. (1 cm=80  $\mu$ m). Eine leichte Stressfaserbildung wird sichtbar.*



*Abb. 29 F-Aktin Expression in CSG-Zellen nach 24 stündiger Normoxie. Konfluente CSG Kulturen wurden 24h unter normoxischen Bedingungen in M199-FCS inkubiert. Anschließend wurde die Expression des F-Aktins mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht. (1 cm=80  $\mu$ m)  
Eine mehr an den Zellmembranen lokalisierte Verteilung des F-Aktins wird deutlich.*





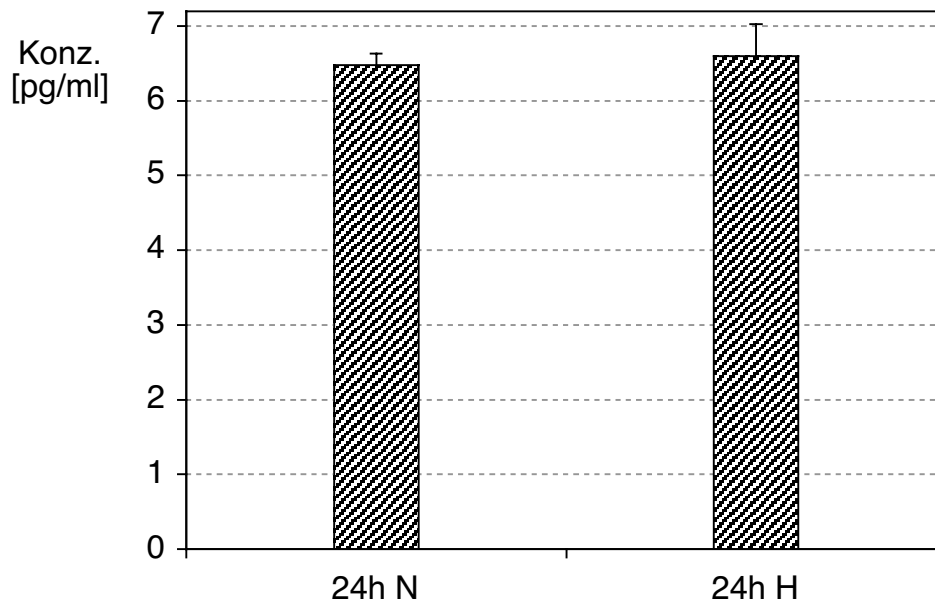
*Abb. 30 F-Aktin Expression in CSG-Zellen nach 24 stündiger Hypoxie. Konfluente CSG Kulturen wurden 24 h unter hypoxischen Bedingungen in M199-FCS inkubiert. Anschließend wurde die Expression des F-Aktins mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht. (1 cm=80  $\mu$ m). Eine leichte Stressfaserbildung wird deutlich.*

Nach 24 stündiger Normoxie war bei allen verwendeten Zelltypen die Aktinfärbung an der Membran lokalisiert. Nach 24 stündiger Hypoxie war bei allen verwendeten Zelltypen eine nur leichte Stressfaserbildung erkennbar.

#### *Quantitative Bestimmung der F-Aktin-Expression*

Da in den vorangegangenen immunhistochemischen Versuchen nur kleine Veränderungen der F-Aktin-Expression nachweisbar waren, sollte dennoch überprüft werden, ob sich der F-Aktin-Gehalt der Zellen verändert. Hierzu wurden BMEC bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert und nach Zugabe von FCS-freiem Medium 24 Stunden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde den Zellen nach einigen Waschschritten und Fixierung TRITC-Phalloidin zugesetzt und die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran wurde das gebundene Phalloidin mit Hilfe von Methanol extrahiert und die Fluoreszenz gemessen. Es ließen sich hierbei keine Unterschiede im F-Aktin Gehalt zwischen normoxischen und hypoxischen Bedingungen nachweisen.





*Abb. 31 F-Aktinegehalt von BMEC nach 24 stündiger Normoxie und Hypoxie*  
Konfluente BMEC-Monolayer wurden nach 24 stündiger Inkubation unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für eine Stunde mit TRITC-Phalloidin bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurden das gebundene Phalloidin mit Methanol extrahiert und die Fluoreszenz gemessen. Aus diesen Daten konnte dann die Konzentration des F-Aktins in pg bestimmt werden. Die einzelnen Werte entsprechen dem MW  $\pm$  SEM (n=10).

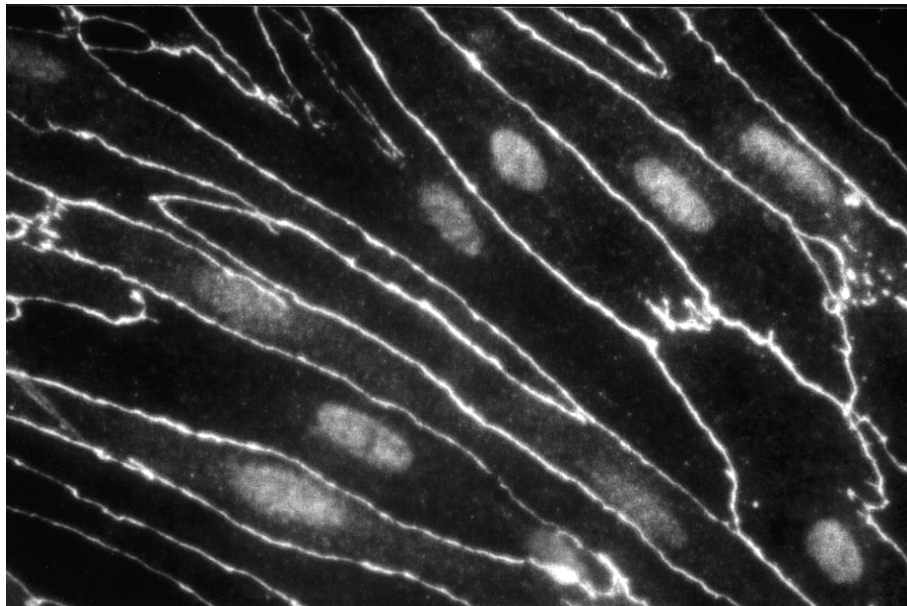
### **3.5. Rolle des VEGF bei der hypoxiebedingten veränderten ZO-1 Expression**

Da Hypoxie-bedingte Permeabilitätsveränderungen durch unter Hypoxie vermehrt gebildetem VEGF hervorgerufen werden, sollte überprüft werden, ob auch hypoxiebedingte Veränderungen der ZO-1 Expression durch die Wirkung des VEGF erklärbar sind.

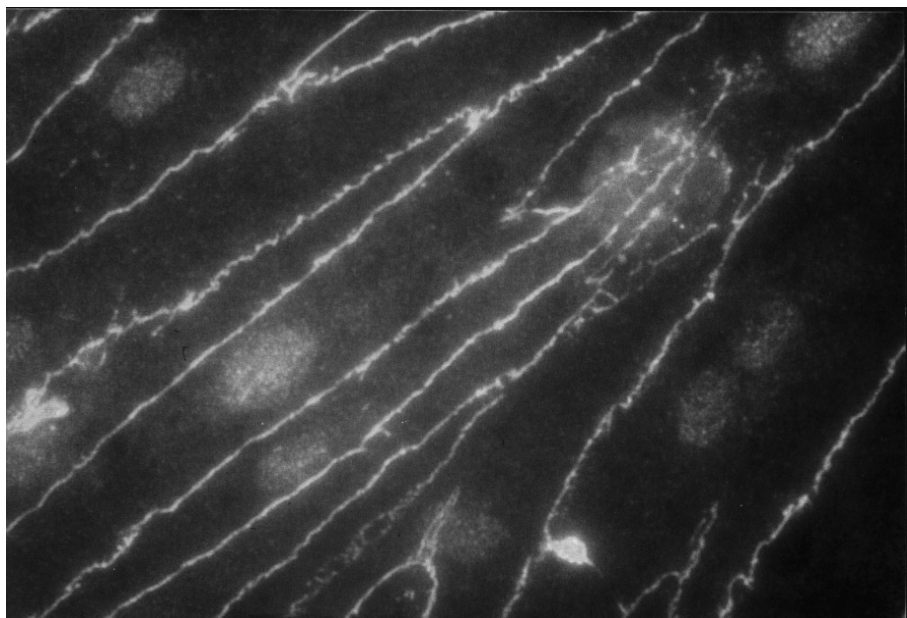
So wurde den Zellmonolayern unter hypoxischen Bedingungen ein polyklonaler neutralisierender Antikörper gegen VEGF zugefügt, um zu untersuchen, ob sich die hypoxiebedingten Veränderungen der ZO-1-Expression verhindern ließen.

Aus den Abbildungen geht hervor, daß die Veränderungen der ZO-1 Expression nach Hypoxie (wie in Abb. 20 gezeigt) durch den VEGF Antikörper vollständig verhindert werden. Dies konnte für BMEC, RBE4 und CSG-Zellen gezeigt werden.

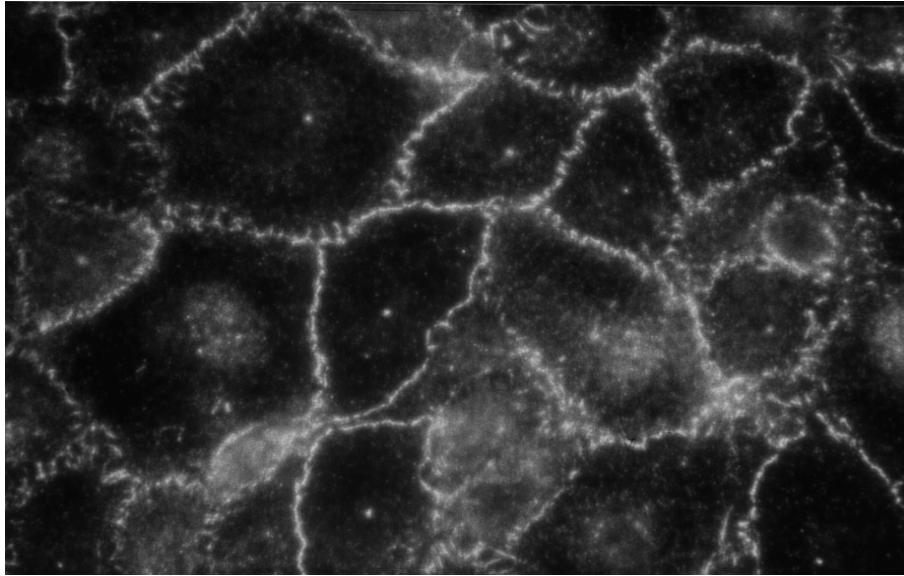
Zusammenfassend läßt sich aus diesen Versuchen der Schluß ziehen, daß unter Einfluß von Hypoxie der von den Zellen exprimierte Faktor VEGF die Permeabilität des Zellmonolayers über den parazellulären Weg zu erhöhen scheint.



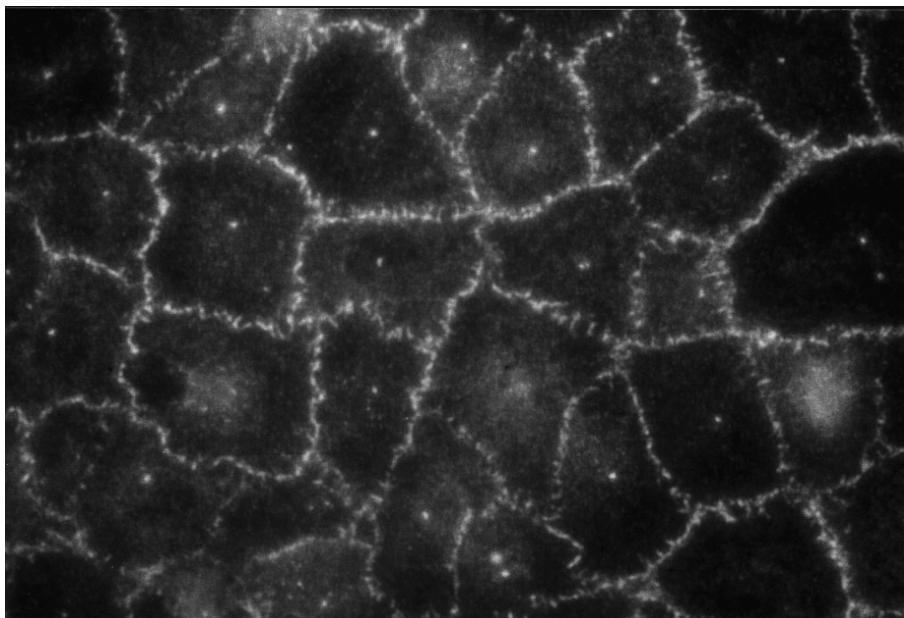
*Abb. 32 ZO-1 Expression in BMEC nach 24 stündiger Normoxie in Gegenwart eines Antikörpers gegen VEGF. BMEC wurden 24h unter Normoxie in Gegenwart eines polyklonalen Antikörpers gegen VEGF (Konz. 5 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht (1 cm=13  $\mu$ m)*



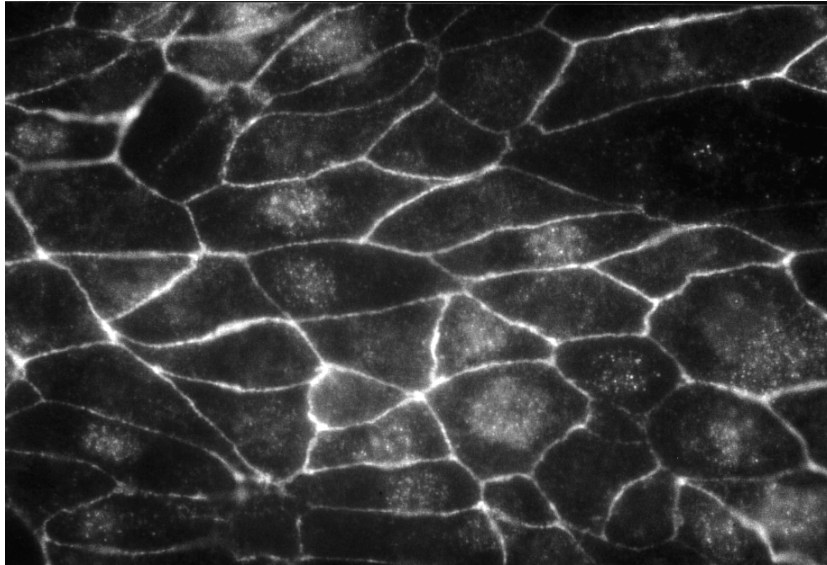
*Abb. 33 ZO-1 Expression in BMEC nach 24 stündiger Hypoxie in Gegenwart eines Antikörpers gegen VEGF. BMEC-Kulturen wurden 24h unter hypoxischen Bedingungen in Gegenwart eines polyklonalen Antikörpers gegen VEGF (Konz. 5 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht (1 cm=13  $\mu$ m).*



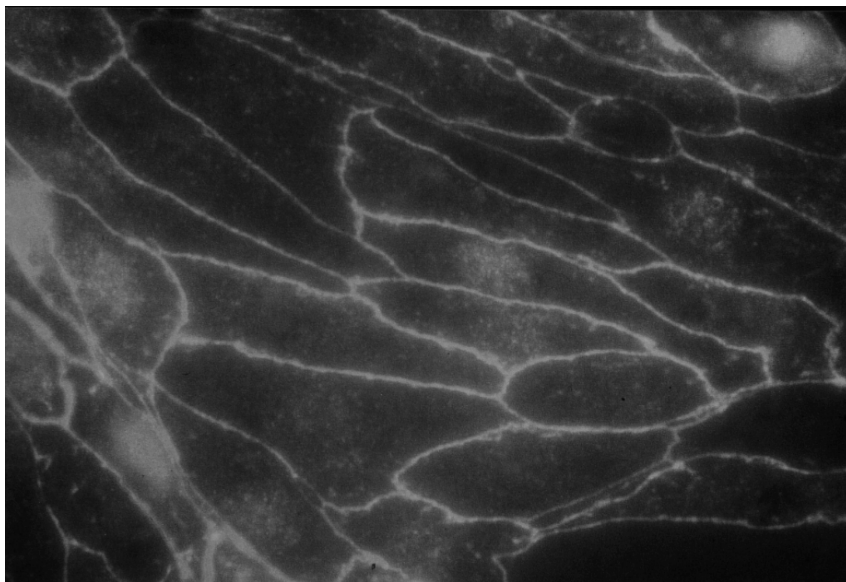
*Abb. 34 ZO-1 Expression in RBE4-Zellen nach 24 stündiger Normoxie in Gegenwart eines Antikörpers gegen VEGF. RBE4-Zellen wurden 24h unter Normoxie in Gegenwart eines polyklonalen Antikörpers gegen VEGF (Konz. 5 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht (1 cm=13  $\mu$ m).*



*Abb. 35 ZO-1 Expression in RBE4-Zellen nach 24 stündiger Hypoxie in Gegenwart eines polyklonalen Antikörpers gegen VEGF. RBE4-Zellen wurden 24h unter Hypoxie in Gegenwart eines polyklonalen Antikörpers gegen VEGF (Konz. 5 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht (1 cm=13  $\mu$ m).*



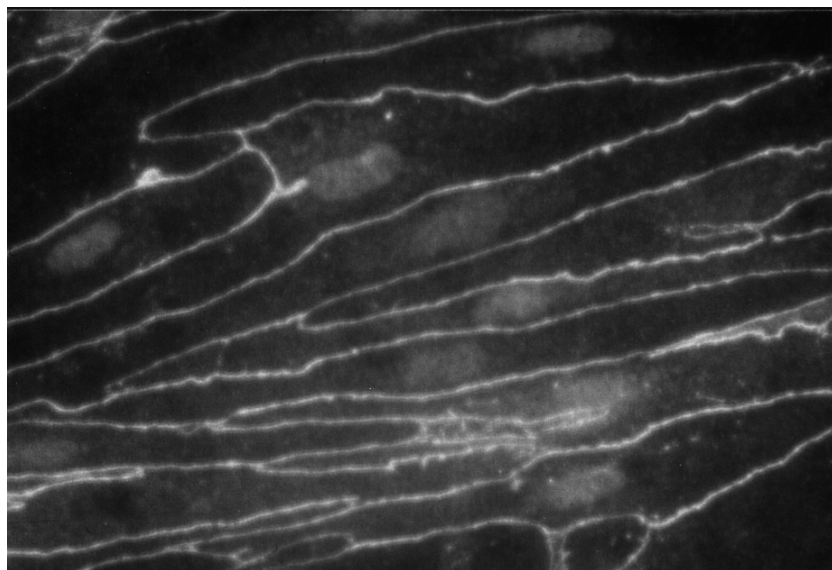
*Abb. 36 ZO-1 Expression in CSG-Zellen nach 24 stündiger Normoxie in Gegenwart eines polyklonalen Antikörpers gegen VEGF. CSG-Zellen wurden 24h unter Normoxie in Gegenwart eines polyklonalen Antikörpers gegen VEGF (Konz. 5 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht (1 cm=80  $\mu$ m).*



*Abb. 37 ZO-1 Expression in CSG nach 24 stündiger Hypoxie (1 cm=80  $\mu$ m). Konfluente CSG-Kulturen wurden 24h unter hypoxischen Bedingungen in Gegenwart eines polyklonalen Antikörpers gegen VEGF (Konz. 5ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht.*

### 3.6. Wirkung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) auf die ZO-1 Expression

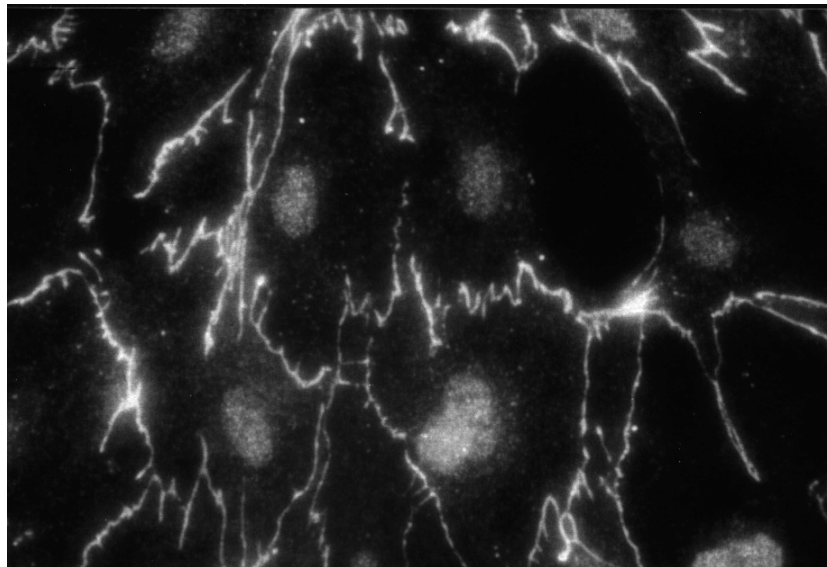
Die im vorangegangenen beschriebenen Ergebnisse, daß die hypoxiebedingte veränderte ZO-1-Expression durch einen Antikörper gegen VEGF verhindert werden konnte, führten zu der Schlußfolgerung, daß unter hypoxischen Bedingungen gebildetes VEGF für die veränderte ZO-1 Expression verantwortlich ist. Bei einer solchen Beteiligung des VEGF ergab sich die zusätzliche Frage, ob die hypoxischen Bedingungen einen Einfluß auf die Ausprägung der durch VEGF hervorgerufenen Veränderungen haben. Deshalb wurde den Zellen zunächst unter normoxischen Bedingungen VEGF zugegeben.



*Abb. 38 ZO-1 Expression in BMEC nach 24 stündiger Normoxie. Konfluente BMEC-Kulturen wurden 24h unter normoxischen Bedingungen in M199-FCS unter Zusatz von rekombinanten VEGF (5 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht (1 cm=13 µm).*

In diesen Versuchen konnte jedoch keine durch VEGF hervorgerufene Veränderung nachgewiesen werden, so daß ein Zusammenhang zwischen hypoxischen Bedingungen und der Wirkung des VEGF postuliert werden kann. Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Fischer et al., die zeigten, daß unter normoxischen Bedingungen zugefügtes VEGF keine Permeabilitätsanstiege bewirkte. Sie zeigten weiterhin, daß VEGF die Permeabilität über eine Aktivierung der NO-Synthetase bzw. über eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid erhöht. NO zeigte allerdings nur in Gegenwart von Antioxidantien einen Effekt auf die Permeabilität<sup>60,93</sup>.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Effekt des VEGF unter normoxischen Bedingungen unter Zugabe eines Antioxidantiums untersucht. Hierbei wurde den Endothelzellmonolayern unter Normoxie  $\alpha$ -Liponsäure (1:1000) zusammen mit VEGF (5 ng/ml) zugefügt. Die ZO-1 Lokalisation wurde nach dieser Behandlung auf dieselbe Weise verändert wie nach 24 stündiger Hypoxie. Somit ist festzustellen, daß VEGF unter normoxischen Bedingungen keine veränderte Lokalisation der ZO-1 Expression zu induzieren scheint, wohingegen unter hypoxischen Bedingungen bzw. unter Zugabe von Antioxidantien Veränderungen nachweisbar waren.



*Abb. 39 ZO-1 Expression in BMEC nach 24 stündiger Normoxie in Gegenwart von VEGF und  $\alpha$ -Liponsäure. Konfluente BMEC-Kulturen wurden 24h unter normoxischen Bedingungen in M199-FCS unter Zusatz von rekombinanten VEGF(5ng/ml) und  $\alpha$ -Liponsäure (1:1000) inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht (1 cm=13  $\mu$ m).*

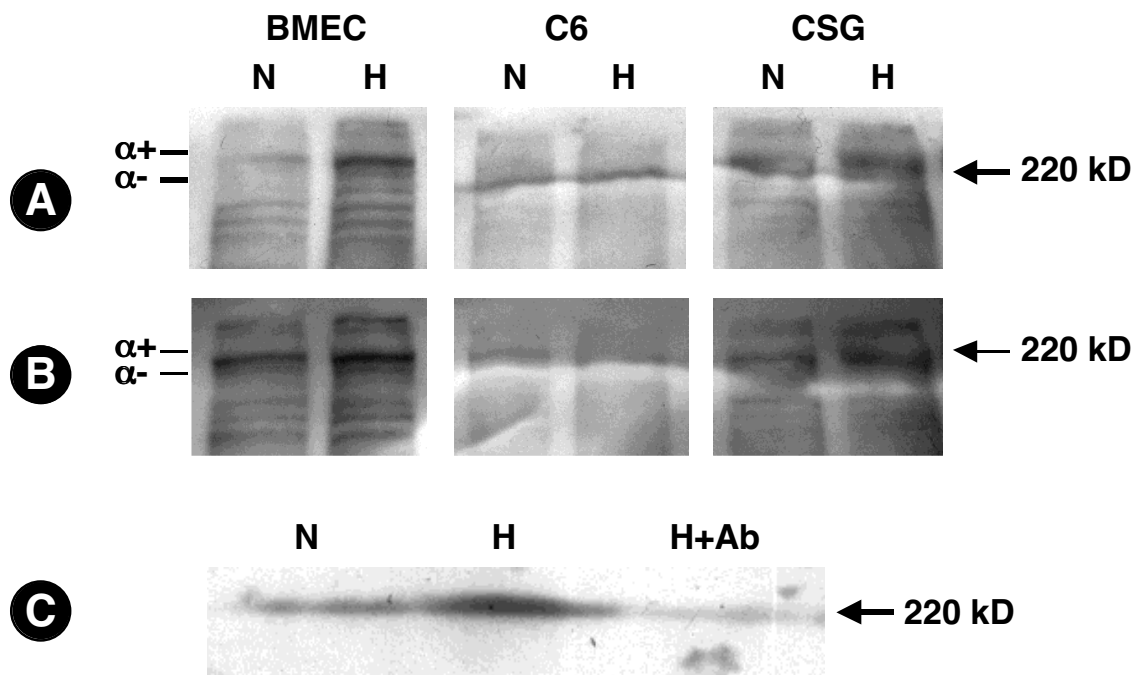
### 3.7. Proteinexpression und Phosphorylierung des ZO-1

#### *Westernblot*

Es stellte sich daraufhin die Frage, ob durch die Veränderung, die an den Tight Junctions und dort am ZO-1 zu erfolgen scheint, die Proteinexpression oder nur die Lokalisation des ZO-1 verändert wird.

Die Ermittlung der Proteinexpression wurde mit Hilfe von Westernblot-Versuchen untersucht. Das Prinzip des Westernblots beruht auf der Auftrennung von Proteinen mit Hilfe eines Elektrophorese-Gels. Es konnten keine Veränderungen der Proteinexpression des ZO-1 zwischen den unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen inkubierten BMEC- und CSG-Zellen nachgewiesen werden. Zur

Bestimmung der Phosphorylierung des ZO-1 wurden die Lysate zur Anreicherung des ZO-1 Proteins immunpräzipitiert wie in "Material und Methoden" beschrieben. Für den nachfolgenden Westernblot wurde ein Antikörper gegen Phosphotyrosin verwendet. Es zeigte sich, daß 24 stündige Hypoxie sowohl in BMEC als auch in CSG eine erhöhte Phosphorylierung bewirkte, die durch einen Antikörper gegen VEGF verhindert werden konnte – wie in BMEC-Kulturen gezeigt wurde. Dies zeigt, daß Hypoxie und auch VEGF keine Reduzierung des ZO-1-Gehaltes der Zellen induziert. Somit handelt es sich bei den immunhistochemisch zu beobachtenden Veränderungen lediglich um eine geänderte Lokalisation des ZO-1 Proteins. C6-Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet, da sie kein ZO-1 Protein exprimieren.



**Abb. 40 A:** Westernblotanalyse aus Zelllysaten von BMEC, C6 und CSG-Zellen nach 24 stündiger Inkubation unter normoxischen (N) und hypoxischen (H) Bedingungen. 20 µg totales Protein wurden durch 7,5% SDS-PAGE-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proteinexpression wurde durch Westernblotting mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen ZO-1 charakterisiert. **B:** Proteinphosphorylierung von ZO-1 aus Zelllysaten von BMEC-, C6- und CSG-Zellen nach 24 stündiger Inkubation unter normoxischen (N) und hypoxischen (H) Bedingungen. 100 µg totales Protein wurden nach Immunpräzipitation mit einem polyklonalen Antikörpers gegen ZO-1 durch 7,5% SDS-PAGE-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend durch Westernblotanalyse mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen Phosphotyrosin charakterisiert.

**C:** Proteinphosphorylierung von ZO-1 aus Zelllysaten von BMEC-Zellen nach 24 stündiger Inkubation unter normoxischen (N), hypoxischen (H) und hypoxischen Bedingungen in Gegenwart eines monoklonalen Antikörpers gegen VEGF (5ng/ml) (H+Ab). Die Proteinphosphorylierung des ZO-1 wurde wie in B beschrieben untersucht.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß unter hypoxischen Bedingungen zwar keine Veränderung des ZO-1-Gehaltes der Zellen auftritt, jedoch eine erhöhte Phosphorylierung des ZO-1 in BMEC- und CSG-Zellen zu beobachten ist. Eventuell könnte die erhöhte Phosphorylierung des ZO-1 mit einer veränderten Lokalisation des ZO-1 in das Cytosol der Zellen einhergehen, was in der Literatur bereits beschrieben wurde<sup>94-96</sup>, wobei der Gehalt der Zellen an ZO-1 jedoch stabil bleibt. Aus den Vorversuchen könnte gefolgert werden, daß VEGF an der Phosphorylierung des ZO-1 unter hypoxischen Bedingungen beteiligt ist, da nach Zugabe eines Antikörpers gegen VEGF keine erhöhte Phosphorylierung in BMEC-Zellen mehr sichtbar wird.

### **3.8. Einfluß von Gliazellen auf hypoxieinduzierte Permeabilitätsveränderungen**

Die im vorangegangenen beschriebenen Permeabilitätsversuche wurden bislang nur mit BMEC-Monolayern durchgeführt. In vivo stehen die Endothelzellen jedoch in direkter Verbindung mit Gliazellen, den sogenannten Astrozyten. Astrozyten besitzen sogenannte Endfüßchen (Endfeet), mit denen sie in Kontakt zu den Endothelzellen stehen. Es ist inzwischen unumstritten, daß Astrozyten gewisse Eigenschaften der Endothelzellen induzieren. So wird auch die Expression der Tight Junctions maßgeblich durch die Anwesenheit der Astrozyten mitbestimmt. Es lag somit nahe, die Permeabilitätsversuche nicht nur auf eine Primärkultur von BMEC zu beschränken, sondern die BMEC ebenso mit Astrozyten (wie in Abb.41 dargestellt) und C6-Gliomazellen, einer Astrozytoma-Zelllinie, gemeinsam zu kultivieren. Konditioniertes Medium der Gliazellen, wie unter "Material und Methoden" beschrieben, wurde aufgrund der Induktion von nachgewiesenermaßen gleichen Eigenschaften (s. Arbeiten von S.Fischer) für manche Versuche verwendet.

#### *Zytotoxizitätstest*

Vor Beginn der Versuche zur Untersuchung des Effektes von Hypoxie auf die Permeabilität von BMEC, die mit Astrozyten bzw. C6-Zellen kokultiviert wurden, sollte zunächst untersucht werden, ob sich die Zahl der lebenden Zellen durch Astrozyten-bzw. C6-konditioniertes Medium verändert.

Hierzu wurden BMEC, RBE4 und CSG-Zellen auf 96 well-Platten ausgesät, und nach Konfluenz mit konditioniertem Medium von Astrozyten bzw. C6-Zellen behandelt. BSMC-konditioniertes Medium von glatten Muskelzellen wurde als Negativkontrolle verwendet.



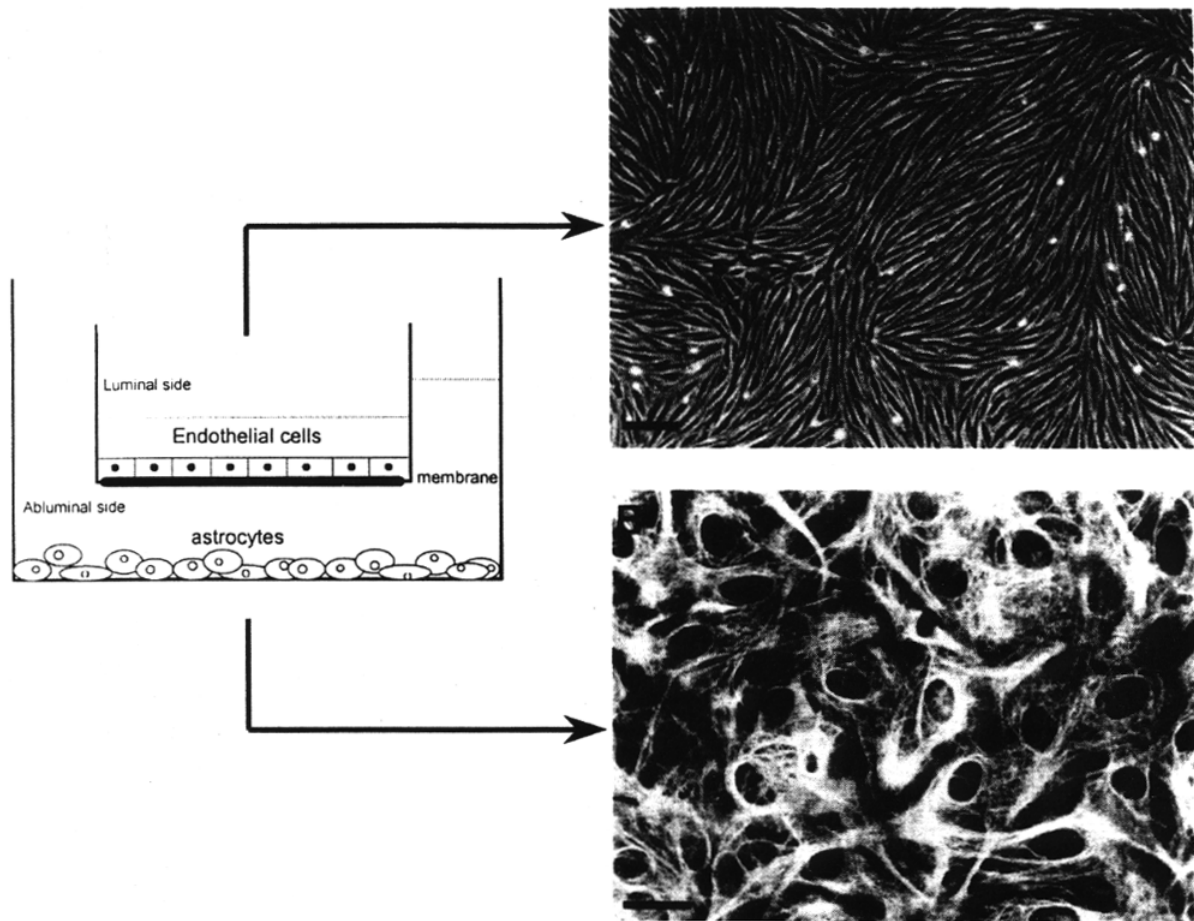


Abb. 41 *In vitro* Modell der BHS: A: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme eines konfluenten Endothelzellmonolayers (1 cm=100  $\mu$ m), B: Immunfluoreszenzfärbung einer Astrozytenkultur mit anti-GFAP-Serum (1 cm=50  $\mu$ m). Quelle; Cecchelli<sup>97</sup>

Der Zytotoxizitätstest ergab, daß die Anzahl der lebenden Zellen von BMEC-, RBE4- und CSG-Zellen nach Zugabe von C6-konditioniertem Medium vermindert wurde (s. Abb. 42 und 43).

RBE4- und CSG-Zellen wurden durch das konditionierte C6-Medium im Vergleich zu den anderen Medien gehemmt. Im Widerspruch hierzu steht das im vorherigen beschriebene Ergebnis, daß C6-Medium den Permeabilitätsanstieg unter hypoxischen Bedingungen verhindert.

Es ließe sich aus diesen scheinbar widersprüchlichen Ergebnissen der Schluß ziehen, daß die verminderte Anzahl lebender Zellen durch das konditionierte C6-Medium im Zusammenhang mit dem unter Hypoxie verhinderten Permeabilitätsanstieg steht. Interpretierbar wäre dies so, daß es infolge der mangelnden Proliferation zum Vorliegen einer festeren Tight Junction-Formation kommt, wohingegen in der proliferierenden Zellkultur durch die wechselnde Formationsänderung eine gesteigerte Möglichkeit zur Permeabilität vorliegt.

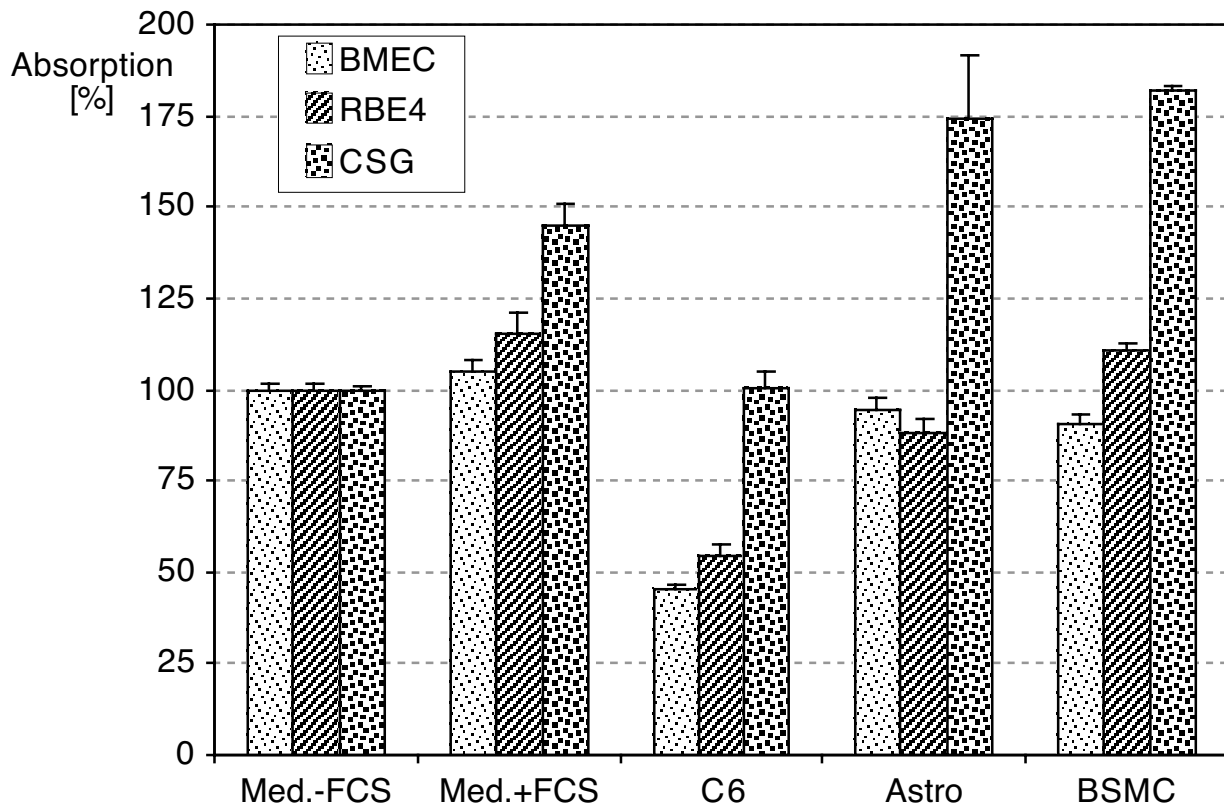


Abb. 42 Zytotoxizitätstest von BMEC, RBE4 und CSG nach 24 stündiger Normoxie. Die Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen in Medium M199 ohne FCS (Med.-FCS), mit FCS (Med.+FCS) oder 24 Stunden unter normoxischen Bedingungen in konditioniertem Medium ohne FCS von C6-Zellen (C6), Astrozyten (Astro) oder glatten Muskelzellen (BSMC) kultiviert. Anschließend wurde die Anzahl der lebenden Zellen mittels eines nicht radioaktiven Kits anhand der Absorptionswerte bestimmt. Die Anzahl der lebenden Zellen, die nach 24 stündiger Normoxie in Kontrollkulturen, d.h. in solchen, die in Normoxie in M199 ohne FCS kultiviert wurden, vorlag, wurde gleich 100% gesetzt. Die einzelnen Werte entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  SEM ( $n=4$ ).

Zur Durchführung der Permeabilitätsversuche wurden die BMEC wie in den vorangegangenen Versuchen auf mit Rattenschwanzkollagen beschichtete Polycarbonatfilter ausgesät.

Die Astrozyten hingegen wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichtete 24 well-Platten ausgesät. Nach zweitägiger Kultivierung wurden die BMEC-Filter auf die inzwischen konfluenten Astrozyten gestellt. (s. Abb.41)

Nach weiterer viertägiger Kultivierung konnten die Zellen für Permeabilitätsversuche verwendet werden.

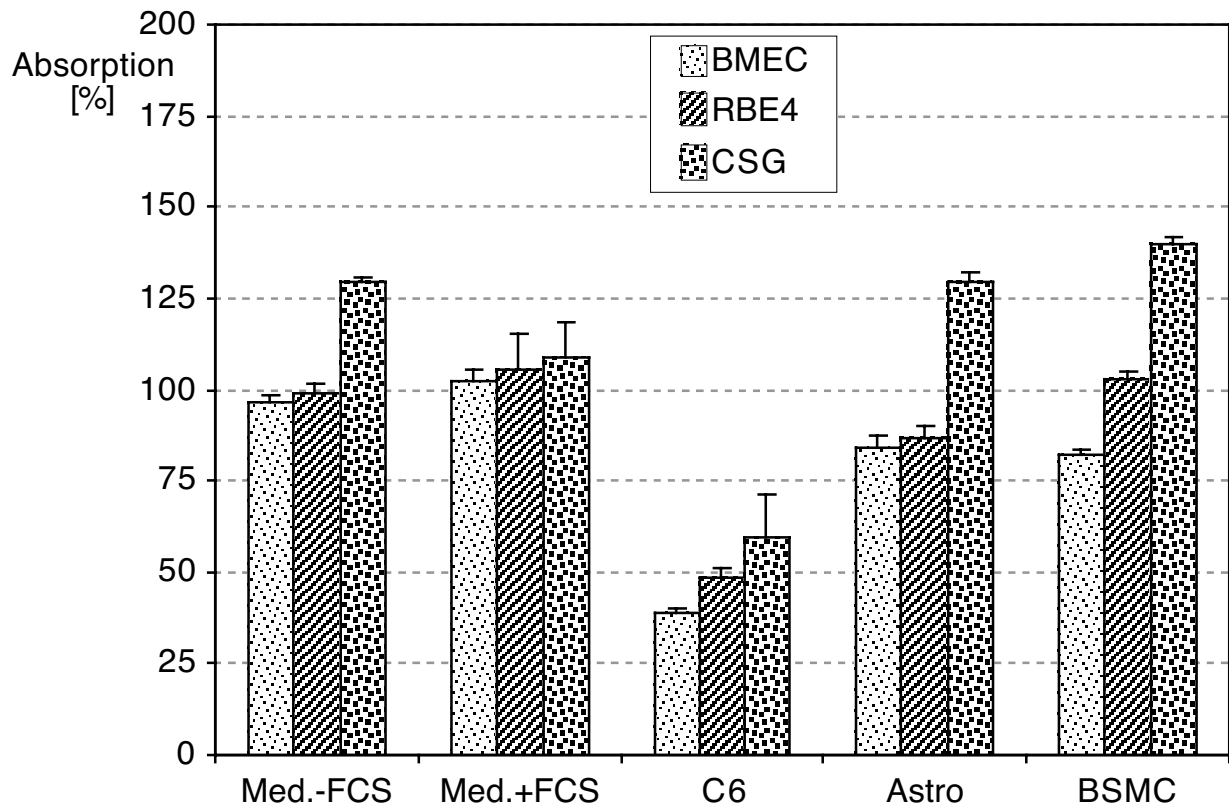


Abb. 43 Zytotoxizitätstest von BMEC, RBE4 und CSG nach 24 stündiger Hypoxie. Die Zellen wurden unter hypoxischen Bedingungen in Medium M199 ohne FCS (Med.-FCS), mit FCS (Med.+FCS) oder 24 Stunden unter hypoxischen Bedingungen in konditioniertem Medium ohne FCS von C6-Zellen (C6), Astrozyten (Astro) oder glatten Muskelzellen (BSMC) kultiviert. Anschließend wurde die Anzahl der lebenden Zellen mittels eines nicht radioaktiven Kits anhand der Absorption bestimmt. Die Anzahl der lebenden Zellen, die nach 24 stündiger Normoxie in Kontrollkulturen, d. h. in solchen, die in Normoxie in M199 ohne FCS kultiviert wurden, vorlag, wurde gleich 100% gesetzt. Die einzelnen Werte entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  SEM ( $n=4$ ).

### 3.9. Einfluß von Gliazellen auf die Permeabilität des BMEC-Monolayers unter normoxischen Bedingungen

Der Einfluß von Astrozyten und C6-Gliomazellen auf die Ausbildung der BMEC-Monolayer wurde nach 3-6-tägiger Kokultur durch die Messung des transendothelialen Widerstandes (TER) bestimmt. Diese Messung stellt eine Methode zur Bestimmung der Ionenpermeabilität dar<sup>98</sup>. Astrozyten induzierten den TER von  $104 \pm 7 \Omega\text{cm}^2$  auf  $219 \pm 20 \Omega\text{cm}^2$  nach viertägiger Kokultivierung. C6-Gliomazellen zeigen in etwa dieselben Effekte und steigerten den TER auf  $180 \pm 12 \Omega\text{cm}^2$  unter denselben Kulturbedingungen ( $n=10$ ).

In den Versuchen zeigte sich deutlich, daß die Permeabilität unter normoxischen Bedingungen von BMEC-Monolayern ohne Kokultur wesentlich höher war, als bei BMEC mit C6-Gliomazell-Kokultur (Abb.44). Noch weniger stieg die Permeabilität bei einer Kokultur mit Astrozyten an. Die Unterschiede im Anstieg der Permeabilität zwischen Astrozyten und C6-Gliomazellen sind jedoch nicht signifikant.

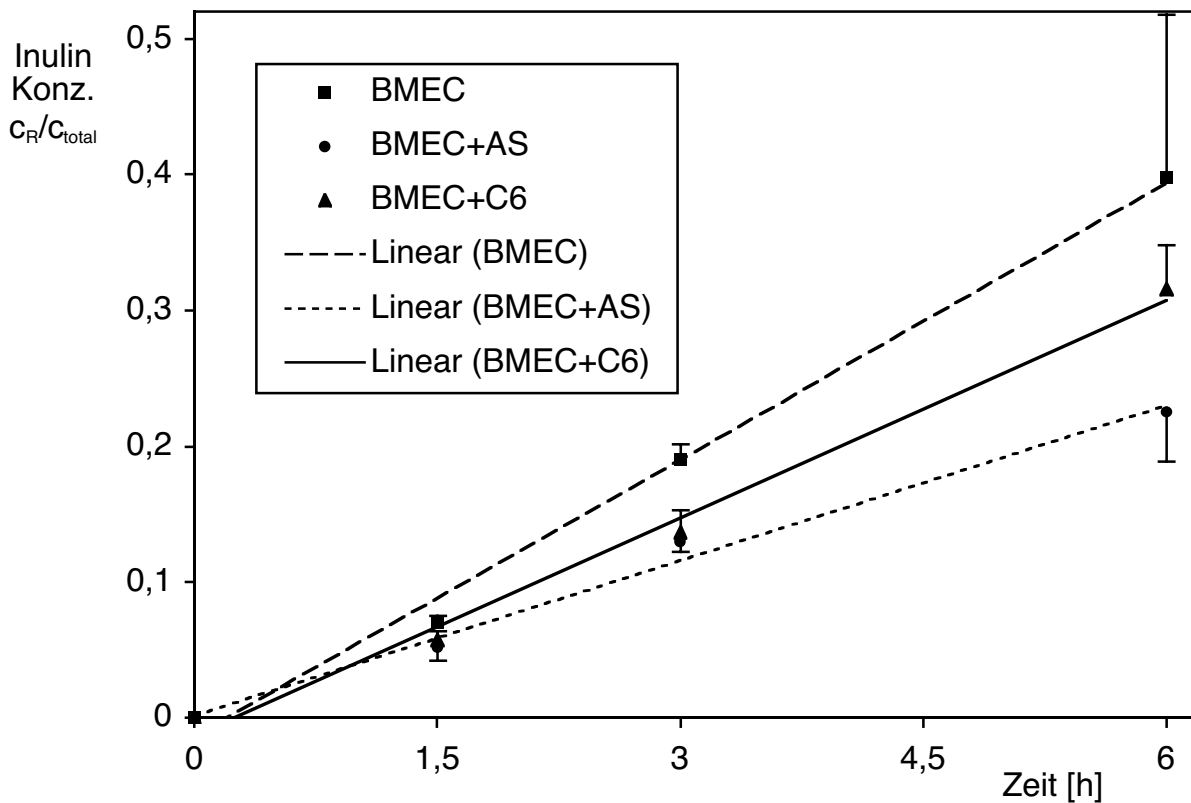


Abb. 44 Einfluß von Gliazellen auf die Zeitabhängigkeit der Passage von [ $^3\text{H}$ ] markiertem Inulin durch den Endothelzellmonolayer. Untersuchung der Permeabilität des BMEC-Monolayers nach viertägiger Kokultivierung von Astrozyten und C6-Zellen.. BMEC wurden in Kokultur mit Astrozyten und C6-Gliomazellen wie in "Material und Methoden" beschrieben kultiviert und unter normoxischen Bedingungen für 1, 5, 3 oder 6h bei 37°C inkubiert. Der Anteil des [ $^3\text{H}$ ] markierten Inulins, das den Monolayer nach 1,5, 3 oder 6h unter normoxischen Bedingungen passiert hatte, wurde durch die totale Konzentration des [ $^3\text{H}$ ] Inulins, das in den oberen Anteil der Filter zu Beginn des Experimentes pipettiert worden war, geteilt ( $C_R/C_{total}$ ). Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 15$ ).

### **3.10. Einfluß der Gliazellen auf hypoxiebedingte Permeabilitätsveränderungen des Endothelzell-Monolayers**

Weiter sollte untersucht werden, ob ein Permeabilitätsanstieg der BMEC-Monolayer unter hypoxischen Bedingungen mit Hilfe der Kokultivierung von Astrozyten und C6-Zellen verhindert oder reduziert werden könnte. Hierzu wurden die BMEC auf Filtern kultiviert, und nach viertägiger Kultivierung wie oben bereits beschrieben auf Astrozyten gestellt. Nach viertägiger Kokultivierung wurde die Permeabilität nach unterschiedlichen Hypoxiezeiten bestimmt. Als Tracer wurde Evansblue-Albumin (EBA) verwendet. Die Zellen wurden für die Versuche 1,5, 3 und 6 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert und anschließend die Konzentration des EBA gemessen (Abb.45).

BMEC wurden in Kokultur mit Astrozyten und C6-Gliomazellen wie in "Material und Methoden" beschrieben kultiviert und unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen für 1,5, 3 oder 6h bei 37°C inkubiert. Der Anteil des EBA, der den Monolayer nach 1,5, 3 oder 6h unter normoxischen Bedingungen passiert hatte, wurde durch die totale Konzentration des [<sup>3</sup>H] Inulin, das in den oberen Anteil der Filter zu Beginn des Experimentes pipettiert worden war, geteilt ( $C_R/C_{total}$ ) und als 100% gesetzt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SEM (n=15).

Da sowohl Astrozyten wie auch C6-Zellen als Astrozytoma-Zelllinie in der Lage sind hypoxiebedingte Permeabilitätsveränderungen im gleichen Ausmaß zu vermindern, wurden die folgenden Versuche nur noch mit C6-Zellen durchgeführt.

Nachteile der Astrozytoma-Zelllinie lagen allerdings zum einen darin, daß es sich hierbei um eine Tumorzelllinie handelt, und diese eigentlich permeabilitäts-erhöhende Eigenschaften besitzen sollte. In unserem Fall konnte diese Theorie jedoch nachgewiesenermaßen nicht bestätigt werden, denn die Astrozytomazelllinie verhinderte eindrucksvoll einen Anstieg der Permeabilität unter hypoxischen Bedingungen in gleichem Ausmaß wie die Astrozyten.

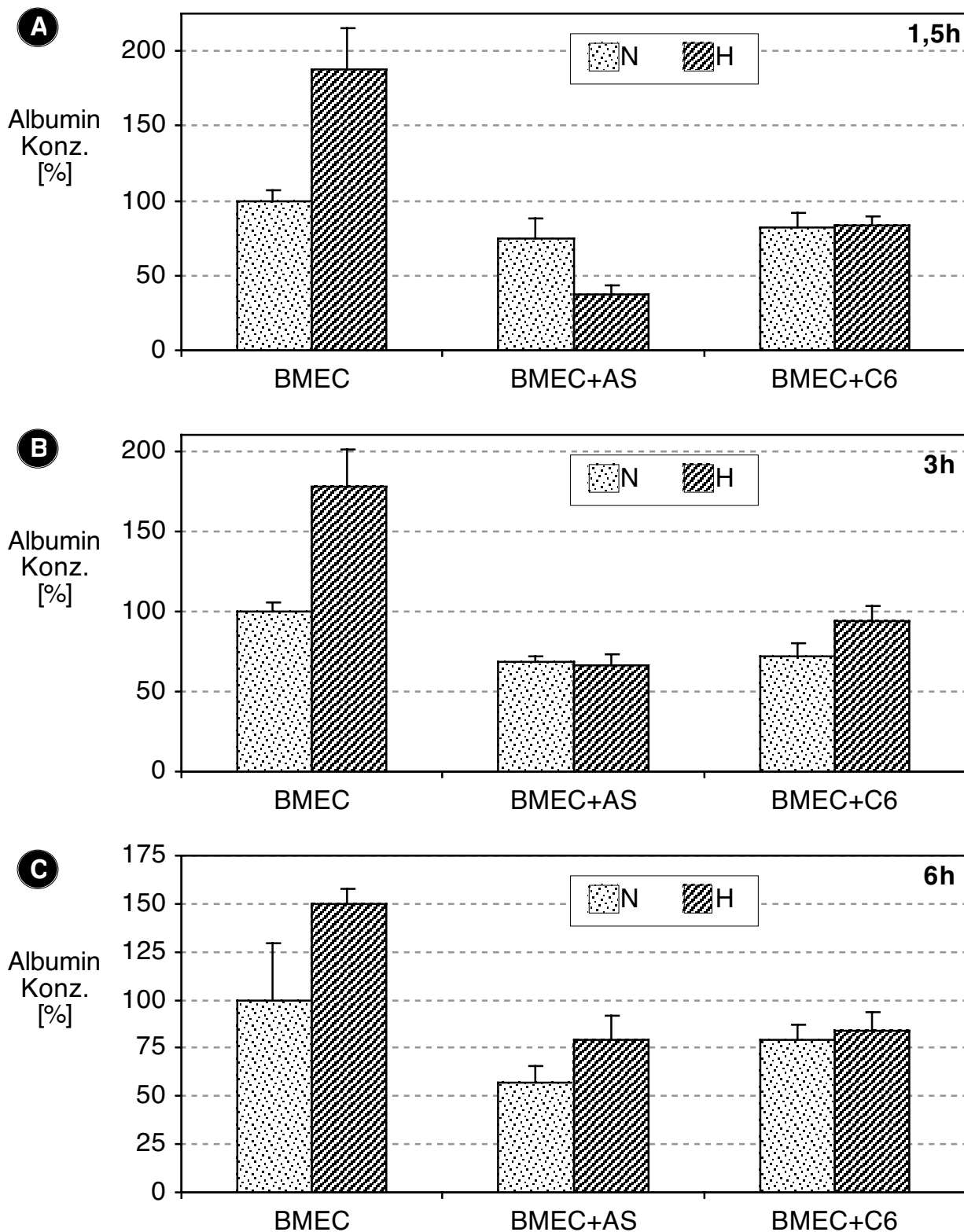


Abb. 45 Permeabilität des BMEC-Monolayers für Evansblue-Albumin (EBA) nach 1,5h (A), 3h (B) und 6h (C) unter normoxischen (N) und hypoxischen (H) Bedingungen ohne (BMEC) und mit Kokultur von Astrozyten (BMEC+As) oder C6-Gliomazellen (BMEC+C6).

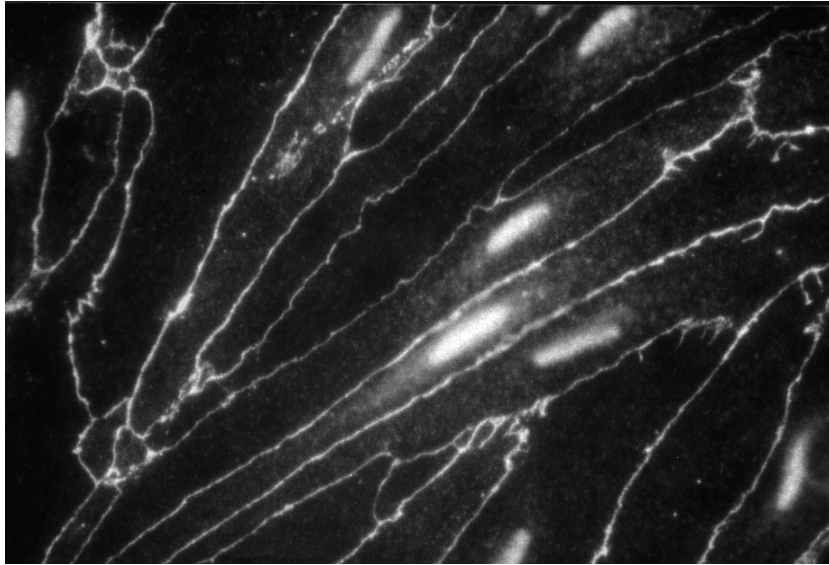
### **3.11. Wirkung von C6- konditioniertem Medium auf die Expression des ZO-1**

In den vorangegangenen Permeabilitätsversuchen war ein verminderter Anstieg der Permeabilität unter Kokultivierung mit Astrozyten oder Astrozytomazellen deutlich geworden. Es sollte in den folgenden Versuchen untersucht werden, inwieweit der verminderte Permeabilitätsanstieg mit einer veränderten Expression des Tight Junction Proteins ZO-1 korrelieren könnte. Die Expression des ZO-1 wurde hierbei immunhistochemisch bestimmt. Die BMEC wurden hierfür auf Rattenschwanzkollagen- beschichteten Petrischalen ausgesät und fünf Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Die konfluenten BMEC-Monolayer sollten nun immunhistochemisch untersucht werden. Hierzu sollten die Monolayer auch im Hinblick auf induzierende Eigenschaften von C6-Gliomazellen untersucht werden. Da die in den Permeabilitätsuntersuchungen verwendeten Filter für immunhistochemische Präparationen jedoch ungeeignet waren, und eine direkte Kokultur nicht möglich war, da die Zellen hinterher in der Petrischale nicht mehr sauber voneinander getrennt werden können, wurde den Zellen stattdessen von den C6-Zellen gewonnenes konditioniertes Medium zugesetzt. Das Medium wurde hierbei für die Dauer von 24 Stunden auf den Zellen belassen, und die Zellen entweder unter hypoxischen oder normoxischen Bedingungen inkubiert. Die Überlegung war hierbei, daß die Induktion der permeabilitätssenkenden Eigenschaften, über eine Produktion von Mediatoren, die in das Medium abgegeben werden, stattfinden muß. Dies wurde aus dem mangelnden Kontakt der Zellen bei den in Kokultur durchgeführten Permeabilitätsversuchen gefolgert. Konditioniertes Medium von C6-Zellen vermindert den hypoxiebedingten Permeabilitätsanstieg im selben Maß wie bei den Kokulturen bestimmt wurde.

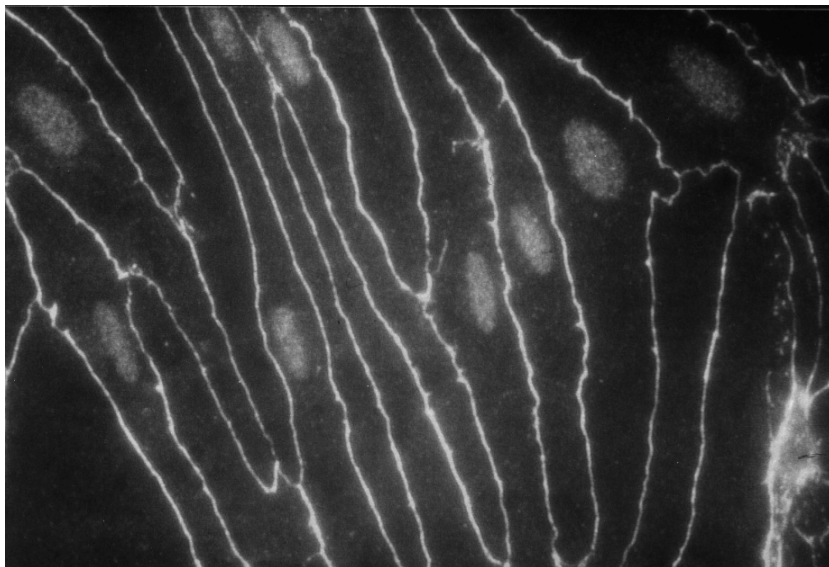
Tatsächlich ließen sich die sonst unter Hypoxie nachweisbaren immunhistochemischen Veränderungen der ZO-1-Expression nach 24 stündiger Inkubation mit C6-konditioniertem Medium nicht mehr nachweisen (s. Abb.46 und 47).

### **3.12. Statistik**

Zur Ermittlung von statistischen Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem multiplen Vergleich nach der Bonferroni-Methode verwendet. Waren die Voraussetzungen für diesen Test nicht gegeben, wurde alternativ auf den parameterfreien Kruskal-Wallis-Test mit multiplen Vergleichen nach Dunn zurückgegriffen.



*Abb. 46 ZO-1 Expression in BMEC nach 24 stündiger Normoxie. Konfluente BMEC Kulturen wurden 24h unter normoxischen Bedingungen in C6-konditioniertem Medium inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht (1 cm=13  $\mu$ m).*



*Abb. 47 ZO-1 Expression in BMEC nach 24 stündiger Hypoxie. Konfluente BMEC Kulturen wurden 24h unter hypoxischen Bedingungen in C6-konditioniertem Medium inkubiert. Anschließend wurde die ZO-1 Expression mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht (1 cm=13  $\mu$ m).*



## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, pathophysiologische Vorgänge wie Hypoxie und deren Auswirkungen auf Endothelzellen, die Teil der Bluthirnschranke *in vivo* sind, zu untersuchen.

Die Bluthirnschranke (BHS) hat wesentlichen Anteil an Funktionen zum Schutze des Gehirns. Von Endothelzellen in den Kapillaren des Gehirnes gebildet, trägt sie entscheidend zur Homöostase des Zentralnervensystems bei, indem sie „äußere Einflüsse“ wie Schwankungen im Elektrolythaushalt, bakterielle Infektionen, etc. wirksam abfängt.

Einen Anteil an diesen Eigenschaften haben vor allem feste Verbindungen zwischen den Endothelzellen, sogenannte „Tight Junctions“. Hierbei handelt es sich um komplexe an der Membran lokalisierte Proteinstrukturen zwischen den Zellen, die durch unterschiedliche Einzelproteine zusammengesetzt sind.

Pathologische Bedingungen wie lokale Ischämie oder Hirntumoren führen häufig zu einer verminderten Funktion der Bluthirnschranke. Als Folge hiervon kann es u. a. zur Entwicklung eines vasogenen Hirnödems kommen <sup>99</sup>.

Zur genaueren Untersuchung der unter Hypoxie auftretenden Permeabilitätszunahme der BHS verwendeten wir ein *in vitro* Modell, das aus primären mikrovaskulären Hirnendothelzellen vom Schwein bestand. Die Permeabilität der Endothelzellmonolayer bei *in vitro* Modellen ist nachgewiesenermaßen wesentlich höher als unter den Bedingungen, die *in vivo* vorherrschen <sup>39</sup>.

Dies liegt wohl daran, daß unter *in vitro* Bedingungen insuffizientere Tight Junctions als *in vivo* ausgebildet werden. Die *in vitro* Situation bleibt ein Modell, bei dem keine optimalen Bedingungen wie *in vivo* erreicht werden können <sup>19</sup>.

Die BMEC konnten aufgrund ihrer Morphologie, der hohen Anzahl an LDL-positiven Zellen und dem geringen Nachweis an „ $\alpha$ -smooth muscle“ Aktin eindeutig als Endothelzellen charakterisiert werden. Ebenso zeigten sie eine positive Von-Willebrand-Faktor-Färbung.

Es sollte überprüft werden, ob die Versuchsbedingungen (24 stündige Hypoxie) eine schädigende Wirkung auf die Anzahl der lebenden Zellen haben. Dazu wurde zu Beginn der Versuche nach Inkubation der Zellen für die Zeit von 6 bzw. 24 Stunden unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen die Zahl der lebenden Zellen mit Hilfe eines nicht radioaktiven Kits bestimmt. Die Viabilität der Zellen zeigte nach 24 stündiger Hypoxie gegenüber der nach 24 stündiger Normoxie keine signifikanten Veränderungen. Dies korreliert mit Ergebnissen von S. Fischer et al.,

die nachweisen konnten, daß der LDH-Gehalt, der nach 24 stündiger Hypoxie im Überstand der Zellkulturen gemessen wurde im Vergleich zur Normoxie nicht erhöht war<sup>100</sup>. Eine Membranschädigung der Zellen, bei der LDH durch die Membran ins Medium gelangt, konnte somit ausgeschlossen werden.

Der Zusatz von FCS zum Inkubationsmedium zeigte keine Wirkung, da die Zellen zu Versuchsbeginn bereits konfluent waren, und so eine Proliferation ausblieb. Die isolierten Hirnendothelzellen wurden aufgrund dieser Ergebnisse verwendet, um den Einfluß von bis zu 24 stündiger Hypoxie auf die Permeabilität des Endothelzellmonolayers zu untersuchen.

Für die Versuche zur Messung der Permeabilität wurden zwei verschiedenen Tracer verwendet.

Zum einen wurde Evansblue-markiertes Albumin, für das sowohl transzytotische wie auch parazelluläre Transportwege beschrieben wurden, verwendet, zum anderen Tritium-markiertes Inulin, das den Monolayer auf parazellulärem Wege passiert.<sup>101,102</sup>

Die unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen durchgeführten Versuche zeigten nach 1,5, 3 und 6 Stunden unter Hypoxie deutliche Permeabilitätsanstiege, sowohl bei den Versuchen mit EBA, wie auch mit Inulin, gegenüber der normoxischen Kontrolle.

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß es unter hypoxischen Bedingungen zu einer Veränderung der Durchlässigkeit des Endothelzellmonolayers kommt, und daß das Modell geeignet ist hypoxie-bedingte Permeabilitätsanstiege zu messen, was bereits beschrieben wurde<sup>103</sup>.

Da der Tracer Inulin den Endothelzellmonolayer über den parazellulären Weg passiert, für EBA hingegen beide Wege beschrieben wurden, sollte überprüft werden über welchen Weg EBA den Monolayer in unserem Modell passiert.

Dazu wurde der transzelluläre Weg unter normoxischen Bedingungen mit Hilfe von N-ethylmaleimide (NEM), eines Hemmstoffes der Transzytose, blockiert<sup>90</sup>. Dagegen verändert NEM den parazellulären Weg nicht<sup>84</sup>. Die Zugabe von NEM bewirkte bis zu einer Inkubationszeit von 10 Minuten keine signifikanten Permeabilitätsveränderungen des Endothelzellmonolayers gegenüber EBA. Dies zeigt, daß EBA in unserem Modell den Endothelzellmonolayer parazellulär passiert. Nach weiteren zehn Minuten jedoch stieg bei den Filtern, denen NEM zugesetzt worden war, die Permeabilität stärker an als bei den Kontrollfiltern. Der nach längeren Inkubationszeiten mit NEM zu beobachtende Permeabilitätsanstieg ist durch eine

Schädigung der Membranen erklärbar, wie von Schnitzer et al. bereits gezeigt wurde<sup>90</sup>.

In weiterführenden Versuchen sollte der Mechanismus des hypoxie-bedingten parazellulären Permeabilitätsanstieges genauer untersucht werden.

Parazelluläre Permeabilität erfolgt im wesentlichen auf der Ebene der Tight Junctions. Daher fokussierten sich die Untersuchungen zunächst auf die immunhistochemische Bestimmung der Expression des ZO-1 Proteins, da es sich hierbei um einen Bestandteil der Tight Junction handelt. Nachweisbare Veränderungen in der Expression dieses Proteins wurden unter hypoxischen Bedingungen an den Tight Junctions deutlich. Darüberhinaus könnte hierin ein Erklärungsansatz für den parazellulären Permeabilitätsanstieg unter Hypoxie gesehen werden.

Bei den immunhistochemischen Anfärbungen des ZO-1 zeigte sich deutlich eine Zerstörung der Kontinuität der Tight Junctions unter hypoxischen Bedingungen.

Zu begründen wäre dies mit einer Beteiligung des ZO-1 an den sich unter hypoxischen Bedingungen in der Zelle bzw. an den Tight Junctions vollziehenden Veränderungen. In verschiedenen Studien wurden bereits ähnliche Veränderungen des ZO-1 dokumentiert, wobei in diesen Studien jedoch andere Versuchsbedingungen untersucht wurden. In Studien von Ricken und Blum, in denen Rinderhirn-endothelzellen verwendet wurden, konnte nach Zugabe von Interferon- $\gamma$  ein ähnliches Zickzackmuster als Beispiel einer Zerstörung der Kontinuität der Tight Junction in der immunhistochemischen Anfärbung des ZO-1 dokumentiert werden<sup>104,105</sup>.

F-Aktin als Bestandteil des Zytoskeletts wurde als weiteres Protein gewählt, da dieses Protein, wie im vorangegangenen beschrieben, ebenfalls eng mit der Tight Junction und hier mit ZO-1 assoziiert ist<sup>91,92</sup>. Durch die immunhistochemische Untersuchung des F-Aktins sollte festgestellt werden, ob Veränderungen des Zytoskeletts einen Anteil an den Permeabilitätsveränderungen haben. Oder, ob die veränderte Lokalisation des Tight Junction Protein ZO-1 unter hypoxischen Bedingungen eine veränderte Expression des mit ihm assoziierten Zytoskelettes und hierbei des F-Aktins nach sich zieht, oder damit einhergeht. Die Versuche zeigten nach 24 stündiger Inkubation unter normoxischen Bedingungen eine Lokalisation des F-Aktins an der Membran der Zellen. Dies wurde sowohl bei BMEC- wie auch bei RBE4- und CSG-Zellen deutlich. Nach 24 stündiger Inkubation unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich eine leichte Stressfibrilbildung, die ebenfalls bei allen drei Zelllinien nachweisbar war.

Obwohl bei den immunhistochemischen Versuchen nur kleine Veränderungen des Zytoskelettes nachweisbar waren, sollte dennoch überprüft werden, ob sich der F-Aktin-Gehalt der Zellen verändert hatte. Daher erfolgte die Durchführung eines F-Aktin-Assays, der jedoch keine Unterschiede im F-Aktin-Gehalt zwischen Zellen, die unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert worden waren, erkennen ließ. Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Watanabe et al., die nach Hemmung der metabolischen Versorgung von Endothelzellen einen Anstieg der parazellulären Permeabilität infolge einer Disintegration des F-Aktingerüsts der Zellen nachweisen konnten<sup>106</sup>. In einer folgenden Studie untersuchten Kuhne et al. das Wesen der Disintegration des F-Aktingerüsts infolge des Defizites der metabolischen Versorgung und fanden eine Defragmentation des F-Aktins. Der Gehalt der Zellen an F-Aktin erwies sich jedoch als stabil. Die gezeigten Veränderungen waren in einem Zeitraum von zwei Stunden reversibel<sup>81</sup>. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen lag zwar keine metabolische Unterversorgung der Zellen vor, jedoch waren die unter hypoxischen Bedingungen gezeigten Veränderungen und der stabile F-Aktingehalt ähnlich den von Watanabe und Kuhne gezeigten Veränderungen. Dies könnte daraufhindeuten, daß Hypoxie und Energieunterversorgung zwei Streßfaktoren darstellen, die auf das F-Aktingerüst der Zelle gleiche Auswirkungen, nämlich einen Permeabilitätsanstieg über Konfigurationsänderungen des Zytoskeletts bei stabilem F-Aktingehalt auslösen.

Es sollten nun weitere Faktoren, auf denen die veränderte Expression des ZO-1 unter hypoxischen Bedingungen beruhen könnte, untersucht werden.

Unter Hypoxie werden verschiedene Faktoren produziert, u. a. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), auch als Vascular Permeability Factor (VPF) bekannt<sup>48-52</sup>.

In vorangegangenen Studien von S. Fischer wurde bereits gezeigt, daß unter Hypoxie gebildetes VEGF einen Anstieg der Permeabilität bewirkte. Deshalb sollte überprüft werden, ob auch die veränderte ZO-1 Expression durch VEGF hervorgerufen wird. Hierzu erfolgte unter hypoxischen Bedingungen die Zugabe eines Antikörpers gegen VEGF. Unseren Vermutungen entsprechend wurde die vorher gezeigte Expressionsänderung des ZO-1 vollständig verhindert. Dies konnte auch für BMEC, RBE4 und CSG Zellen gezeigt werden.

Das Ergebnis, daß veränderte ZO-1 Expression unter Hypoxieeinfluß durch einen Antikörper gegen VEGF verhinderbar war, führte zu der Schlußfolgerung, daß unter hypoxischen Bedingungen gebildetes VEGF für die veränderte ZO-1 Lokalisation verantwortlich ist. Bei einer solchen Beteiligung des VEGF ergab sich die zusätzliche Frage, ob die hypoxischen Bedingungen einen Einfluß auf die

Ausprägung der durch VEGF hervorgerufenen Veränderungen haben. Deshalb wurde den Zellen zunächst unter normoxischen Bedingungen VEGF zugegeben. Hierbei konnte jedoch keine durch VEGF hervorgerufene Veränderung nachgewiesen werden, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von S. Fischer steht<sup>93</sup>. Somit kann ein Zusammenhang zwischen hypoxischen Bedingungen und der Wirkung des VEGF postuliert werden.

Eine wichtige Substanz über die VEGF seine Wirkung entfaltet ist Stickstoffmonoxid (NO). NO wird von der Aminosäure L-Arginin von endothelialen NO-Synthetasen (eNOS) oder der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) freigesetzt<sup>107</sup>. Die genauen Mechanismen über die NO die Permeabilität moduliert, sind noch umstritten. In einigen Untersuchungen wurde die Permeabilität durch Hemmung der NO-Synthetase gesenkt, während sie in anderen Studien erhöht wurde. So vermutete beispielsweise Mayhan<sup>108</sup>, daß eine höhere Konzentration an NO in der Lage wäre die Permeabilität über eine Endothelkontraktion zu erhöhen, wohingegen Kubes<sup>109</sup> postulierte, daß derselbe Wirkungsmechanismus über eine Hemmung der Freisetzung des NO ablaufe. Aber eine Vielzahl von Studien konnte zeigen, daß NO die Guanylatcyklase der Zelle aktiviert, was sich in einem Anstieg des cGMP-Spiegels im Zytosol der Zelle äußert<sup>107,110</sup>. Wu et al.<sup>60</sup> zeigten, daß VEGF-NO-abhängige Permeabilitätsanstiege in Koronargefäßen über eine Aktivierung der Guanylatzyklase und eine Induktion einer cGMP-abhängigen Proteinkinase ablaufen. Entsprechend ist gezeigt worden, daß Agenzien, die in der Lage sind intrazelluläre cGMP-Spiegel zu erhöhen, dadurch die Permeabilität für Makromoleküle in Kapillaren sowohl *in vivo*<sup>111</sup> als auch *in vitro*<sup>112</sup> erhöhen.

Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von S. Fischer, die zeigten, daß 8-BRcGMP, welches die cGMP-Spiegel der Zellen erhöht, die Permeabilität des BMEC-Monolayer erhöht. Fischer et al. zeigten weiterhin, daß NO die Permeabilität von BMEC erhöht, wie nach Zugabe eines NO-Donors deutlich wurde. In Gegenwart von L-NMMA wurde die Hypoxie-induzierte Permeabilitätssteigerung verhindert, da dieser Stoff selektiv die NO-Synthetase (NOS) inhibiert.

Die Halbwertszeit von NO unter Normoxie ist sehr kurz, da NO mit molekularem Sauerstoff und Sauerstoffradikalen zu gleichen Anteilen reagiert, woraus Nitrit, Nitrat und Peroxynitrat entsteht<sup>71,72</sup>.

Der wichtigste Weg der NO-Reaktivität ist wohl die schnelle bimolekulare Reaktion von NO mit Superoxid zu Peroxynitrat, die mehr als dreimal so schnell abläuft wie die enzymatische Umwandlung von Superoxid durch die Superoxid-Dismutase<sup>113</sup>. Übereinstimmend damit zeigte Morbidelli et al., daß die durch VEGF induzierte

NO-Produktion durch Superoxiddismutase über eine Verlängerung der Halbwertszeit des NO enzymatisch gesteigert wird <sup>114</sup>.

Die Kinetik der NO-Antioxidationsreaktionen ist abhängig von der Sauerstoffkonzentration und von der Produktion von Superoxiden im Gewebe.

Fischer stellte die Hypothese auf, daß die oxidativen Reaktionen des NO unter Normoxie schneller ablaufen, als die Aktivierung von Second-Messenger-Wegen, die ein Ansteigen der Permeabilität nach sich zögen. Um die Konzentration von Sauerstoffradikalen im Kulturmedium zu senken, wurden natürlicherweise vorkommende Antioxidantien wie  $\alpha$ -Liponsäure dem normoxischen, mit VEGF behandelten Kulturmedium, zugefügt.

Unter diesen Bedingungen steigert VEGF die Permeabilität der BMEC-Monolayer ebenso wie den cGMP -Gehalt. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen bewirkte VEGF in Gegenwart von  $\alpha$ -Liponsäure unter normoxischen Bedingungen Veränderungen der ZO-1 Expression wie immunhistochemisch nachweisbar war. Somit ist festzustellen, daß VEGF unter normoxischen Bedingungen keine Veränderungen in der Expression des Tight Junction Proteins ZO-1 zu induzieren scheint, wohingegen unter hypoxischen Bedingungen bzw. unter Zugabe von Antioxidantien Veränderungen nachweisbar waren.

Die unter hypoxischen Bedingungen veränderte Expression des ZO-1, die vermutlich über durch VEGF induzierte NO-Freisetzung und Induktion von Second-Messenger-Wegen vermittelt wird, geht wahrscheinlich mit einer veränderten Lokalisation des ZO-1 von der Zellmembran ins Zytosol der Zelle vonstatten. Voraussetzung für eine veränderte Lokalisation des ZO-1 könnte eine Phosphorylierung dieses Proteins sein. Entsprechend wurde gefunden, daß unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte Phosphorylierung des ZO-1 erfolgt. Der Gehalt der Zellen an ZO-1 blieb jedoch stabil. Die in den immunhistochemischen Versuchen gezeigte veränderte Expression des ZO-1 könnte somit auf einer erhöhten Phosphorylierung des ZO-1 unter hypoxischen Bedingungen beruhen. Außerdem könnte die erhöhte Phosphorylierung Grund für eine Dissoziation des ZO-1 in das Zytosol und somit für die veränderte Expression und Lokalisation des ZO-1 sein. Dieser Fall würde somit keine Veränderung des Gehaltes an ZO-1 nach sich ziehen, wie ebenso in den Versuchen gezeigt wurde.

In Anwesenheit eines Antikörpers gegen VEGF war keine Phosphorylierung des ZO-1 mehr nachzuweisen. Somit wäre die nicht nachweisbare Phosphorylierung des ZO-1 eine Erklärung dafür, daß mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen VEGF die durch VEGF hervorgerufenen Effekte im Sinne einer veränderten Expression und Lokalisation des ZO-1 ausbleiben. Es läßt sich also schlußfolgern,

daß eine unter hypoxischen Bedingungen verstärkte VEGF-Produktion der Endothelzellen eine verstärkte Phosphorylierung des ZO-1, begleitet von einer Lokalisationsänderung, nach sich zieht. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Resultaten von Antonetti et al., die nachweisen konnten, daß eine durch VEGF getriggerte Phosphorylierung des ZO-1 regulative Auswirkungen auf die parazelluläre Permeabilität hat <sup>115</sup>. Youakim et al. zeigten, daß die Behandlung von intestinalen Epithelzellen mit Interferon  $\gamma$  durch einen Anstieg der parazellulären Permeabilität gekennzeichnet ist. Weitere Untersuchungen ergaben einen totalen Verlust des ZO-1 Proteins und eine Dissoziation des Aktinzytoskelettes in den apikalen Bereichen der Zelle sowie an den Tight Junctions. Youakim et al. sahen hierin die Begründung für den Anstieg der parazellulären Permeabilität <sup>116</sup>. Cohen et al. wiesen in ihren Untersuchungen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen einer VEGF-induzierten Proteinphosphorylierung und einer Beteiligung der Proteinkinase C an Permeabilitätserhöhungen des Endothelzellmonolayers nach <sup>117</sup>. Nach Einsatz eines Tyrosinkinaseinhibitors und eines selektiven Proteinkinase C Inhibitors waren die Veränderungen nicht mehr nachweisbar. Cohen et al. fokussierten in ihren Untersuchungen das Proteinkinase C abhängige Adhärenzprotein  $\beta$ -catenin. Ebenso untersuchten Esser et al. den Einfluß von VEGF auf Komponenten der Adhärenzbindungen der Zelle: VE-cadherin, p120 und ebenso  $\beta$ -catenin zeigten in subkonfluenten Endothelzellkulturen eine gesteigerte Phosphorylierung, die sich jedoch in konfluenten Kulturen nicht mehr nachweisen ließ <sup>15</sup>. Meines Erachtens nach lassen sich jedoch aus den beschriebenen Ergebnissen durchaus Parallelen zum Tight Junction Protein ZO-1 herleiten, das über ähnliche VEGF-induzierte Signaltransduktionswege seine Expression und Lokalisation verändert und somit an der Regulation der parazellulären Permeabilität beteiligt ist. Hieraus wäre eine Erklärung für die veränderte Expression der Tight Junctions unter hypoxischen Bedingungen zu sehen, welche mit einem Permeabilitätsanstieg einhergehen könnte.

Es ist mittlerweile unumstritten, daß viele der charakteristischen Eigenschaften von BMEC durch Astrozyten induziert werden <sup>118,119</sup>. Hiermit assoziiert ist die Regulation von durch Hypoxie hervorgerufenen Permeabilitätsveränderungen, die auf strukturellen Veränderungen der Tight Junctions beruhen <sup>23,47,120,121</sup>. Hierbei sind die Meinungen noch immer geteilt, inwiefern diese Regulation auf einer Sekretion von Faktoren durch die Astrozyten beruht, oder ob ein direkter Zell-Zellkontakt zwischen Astrozyten und Endothelzellen die Voraussetzung darstellt. Durch die Verwendung von BSMC-Medium als Negativkontrolle in unseren Untersuchungen wird noch verdeutlicht, daß sich der beschriebene Effekt der Hemmung eines Permeabilitätsanstieges unter hypoxischen Bedingungen speziell auf Astrozyten und C6-Zellen beschränkt. In einigen Studien wurde bereits gezeigt,

daß die Permeabilitätsveränderungen bzw. strukturellen Veränderungen der Tight Junctions direkten Kontakt zwischen BMEC und Astrozyten-Endfüßchen voraussetzen<sup>122,123</sup>. In anderen Studien hingegen wurde nachgewiesen, daß ein sezernierter Faktor bzw. sezernierte Faktoren maßgeblich die Formation der Tight Junctions beeinflussen<sup>23,47</sup>.

Ogleich die Astrozyten-Endfüßchen *in vivo* eng mit den BMEC assoziiert sind, sind sie doch durch eine Basallamina von den BMEC getrennt und bislang ist kein direkter Zell-Zellkontakt beschrieben worden. Dies deutet darauf hin, daß hierbei andere Wege der Signalübermittlung beschritten werden müssen, um die charakteristischen Eigenschaften des Hirnendothels zu induzieren.

Aufgrunddessen wurde in der hier vorliegenden Untersuchung ein Kokulturmodell eingesetzt, bei dem Gliazellen und BMEC keinen direkten Kontakt hatten, bzw. konditioniertes Medium von Gliazellen eingesetzt und den BMEC zugefügt wurde. Es sollte vor Beginn der Versuche zur Untersuchung des Effektes von Hypoxie auf die Permeabilität von BMEC, die in Kokultur mit Astrozyten bzw. unter Zusatz von konditioniertem Medium kultiviert wurden, überprüft werden, ob sich die Zahl der lebenden Zellen durch Astrozyten-, C6-konditioniertes Medium oder durch Medium von glatten Muskelzellen verändert. Dazu wurde zu Beginn der Versuche nach Inkubation der Zellen für die Zeit von 24 Stunden unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen unter Zusatz der konditionierten Medien die Anzahl der lebenden Zellen mit Hilfe eines nicht radioaktiven Kits bestimmt. Der Zytotoxizitätstest ergab, daß die Anzahl der lebenden Zellen von BMEC nach Zugabe von konditioniertem C6-Zell-Medium vermindert wurde, ebenso verringerte sich die Anzahl lebender RBE4- und CSG-Zellen nach Zugabe des konditionierten Mediums.

Die Kokultur von Astrozyten oder C6-Gliomazellen mit BMEC steigerte den transendothelialen Widerstand um das zweifache, was mit den Ergebnissen von Rubin et al.<sup>23</sup> übereinstimmt.

Außerdem wurden in den unter verschiedenen Zeitabschnitten durchgeführten Permeabilitätsversuchen deutlich, daß sich sowohl unter Kokultivierung mit Astrozyten wie auch mit C6-Gliomazellen ein Anstieg der Permeabilität unter Hypoxie wesentlich schwächer darstellte, als bei den Kontrollgruppen ohne Kokultur. Dieser Effekt scheint unabhängig von der, in Gegenwart von C6-konditioniertem Medium bestimmten verminderten Zellzahl zu sein.

Die Tatsache, daß Astrozyten und Gliomazellen in der Lage sind die gleichen Effekte zu induzieren, ist übereinstimmend in verschiedenen anderen Studien nachgewiesen worden<sup>40,124</sup>. Fischer et al. haben zudem bereits nachgewiesen, daß



derselbe Effekt auf Hypoxie-induzierte Permeabilitätsveränderungen unabhängig davon auftrat, ob konditioniertes Medium von unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultivierten Astrozyten oder C6-Gliomazellen gewonnen worden war. Aufgrund dieser Tatsache vermutete S. Fischer, daß die von Gliazellen sezernierten Faktoren, die unter hypoxischen Bedingungen vermehrt exprimiert werden, nicht bei der verminderten Ausprägung der hypoxie-induzierten Permeabilitätsveränderungen beteiligt sind. Bislang sind nur wenige Studien bekannt, die den Effekt von Gliazellen auf hypoxie-induzierte Permeabilitätsveränderungen untersuchen, wie z. B. Kondo et al.<sup>125</sup>, die zeigten, daß Astrozyten einen Anstieg der Permeabilität von BMEC-Monolayern bei Hypoxie mit nachfolgender Reoxigenierung verhindern. Kondo vermutete, daß Astrozyten in der Lage sein könnten freie Radikale, die von Endothelzellen unter hypoxischen Bedingungen mit nachfolgender Reoxigenierung freigesetzt werden, zu eliminieren. Sauerstoffradikale werden vorzugsweise in der Phase der Reoxigenierung freigesetzt, und da in vorangegangenen Studien bereits nachgewiesen wurde, daß unter hypoxischen Bedingungen von BMEC keine Sauerstoffradikale freigesetzt werden<sup>126</sup>, ist somit die protektive Rolle der Gliazellen in unserem Modell vermutlich nicht mit einer Eliminierungsfunktion für Sauerstoffradikale zu erklären.

Da die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität durch Gliazell- konditioniertes Medium gesenkt wird, scheint die Hypoxie-induzierte Sekretion von einem oder mehreren Faktoren der BMEC, welche die Permeabilität steigern könnten, durch von Gliazellen freigesetzte Faktoren gesenkt zu werden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß durch die Kokultivierung eine Induktion von Eigenschaften der Endothelzellen stattzufinden scheint, die u. a. protektive Wirkungen zu haben scheinen.

Die nachfolgend durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen an BMEC-Monolayern unterstreichen die in den Permeabilitätsversuchen dargestellten Ergebnisse.

BMEC, die 24 Stunden unter Hypoxiebedingungen waren, weisen deutliche Veränderungen in der Expression des ZO-1 im Sinne einer Zerstörung der Kontinuität der Tight Junctions an der Zellmembran auf.

BMEC, denen vor dem Hypoxieversuch konditioniertes C6-Medium zugefügt worden war, weisen die Veränderungen nach Hypoxieeinfluß nicht auf. Dies würde dafür sprechen, daß eine Induktion über die Freisetzung von Faktoren in das Medium zu erfolgen scheint, da bei Zugabe von konditioniertem Medium kein Kontakt von Kokultur und BMEC möglich ist. Gardner et al. wiesen in ihren

Untersuchungen nach, daß die Zugabe von Astrozyten-konditioniertem Medium einen Anstieg des ZO-1 Gehaltes der Zellen nach sich zog, wohingegen Histamin den Gehalt der Zellen an ZO-1 senkte<sup>12</sup>. Dies würde darauf hindeuten, daß der Gehalt der Zellen an ZO-1 eine wesentliche Rolle in der Regulation parazellulärer Permeabilität spielt, durch Astrozyten-konditioniertes Medium induzierbar ist, und so einen Anstieg der Permeabilität unter hypoxischen Bedingungen verhindern kann. Die Feststellung Gardners, daß Histamin die gegenteiligen Effekte hervorruft, stünde in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen, da es sich bei Histamin um einen Entzündungsmediator handelt, der mit einer Steigerung vaskulärer Permeabilität eng assoziiert ist.

#### *Schlußfolgerung*

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß VEGF bei hypoxieinduzierten parazellulären Permeabilitätsveränderungen eine bedeutende Rolle spielt. Eine veränderte Expressionslokalisation des Tight Junction Proteins Zonula occludens 1 könnte an diesem Permeabilitätsanstieg beteiligt sein.

## 5. Zusammenfassung

Nach Bestätigung der unbeeinträchtigten Viabilität der Zellen post 24 stündiger Hypoxie, konnte ein signifikanter Permeabilitätsanstieg unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu Kontrollkulturen über den parazellulären Weg nachgewiesen werden. Dieser Transportweg wurde daraufhin hinsichtlich der Expression des Tight Junction Proteins ZO-1 in BMEC-, RBE4- und CSG-Zellen näher untersucht. Dabei wurde eine veränderte Expressionslokalisation dieses Proteins nach 24 stündiger Hypoxie sichtbar. Nachweislich war diese Veränderung bei allen verwandten Endothel- und Epithelzellen sichtbar. In weiterführenden Untersuchungen, die eine Beteiligung zytoskeletaler Elemente an diesen Veränderungen fokussierten sollten, konnten im Hinblick auf die F-Aktin Expression bei allen verwendeten Zelllinien nur leichte Veränderungen im Sinne einer Streßfaserbildung nachgewiesen werden, wobei der quantitativ bestimmte F-Aktin Gehalt unverändert war.

Da hypoxiebedingte Permeabilitätsveränderungen häufig durch unter hypoxischen Bedingungen gebildetes VEGF hervorgerufen werden, sollte dessen Einfluß hinsichtlich einer veränderten ZO-1 Expression unter hypoxischen Bedingungen untersucht werden. Nach Zugabe eines polyklonalen Antikörpers gegen VEGF konnten die beschriebenen Veränderungen vollständig verhindert werden, was für BMEC-, RBE4- und CSG-Zellen gezeigt werden konnte. Somit scheint das unter Einfluß von Hypoxie gebildete VEGF die Permeabilität des Zellmonolayers über den parazellulären Weg zu erhöhen. In weiterführenden Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen der Wirkung des VEGF und hypoxischen Bedingungen bestätigt werden, da die Zugabe von VEGF zu normoxischen Kulturen keine Veränderungen hervorrief, wohingegen unter Zusatz von VEGF und Antioxidantien zu normoxischen Kulturen ebenfalls eine veränderte Expression des ZO-1 auftrat.

Westernblotanalysen zeigten keine Veränderungen der Proteinexpression des ZO-1 zwischen den unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen inkubierten BMEC- und CSG-Zellen. Allerdings konnte nach Ablauf von 24 stündiger Hypoxie eine erhöhte Phosphorylierung des ZO-1 sowohl bei BMEC als auch bei CSG nachgewiesen werden, die durch einen Antikörper gegen VEGF verhindert werden konnte, wie in BMEC-Kulturen gezeigt wurde. Es zeigt sich, daß VEGF an der Phosphorylierung des ZO-1 unter hypoxischen Bedingungen beteiligt ist. In Kokulturversuchen mit Astrozyten und C6-Zellen zeigte sich bereits unter normoxischen Bedingungen eine geringere Permeabilität als bei den Kontrollkulturen ohne Kokultur. Unter hypoxischen Bedingungen wurde der Permeabilitätsanstieg sowohl von Astrozyten als auch von Gliomazellen

eindrucksvoll verhindert. In sich anschließenden immunhistochemischen Versuchen wurde den BMEC-Zellen konditioniertes Medium von C6-Gliomazellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für die Dauer von 24 Stunden zugesetzt. Tatsächlich konnten die vorher unter Hypoxie nachweisbaren Veränderungen im Sinne einer veränderten ZO-1 Expression nun nicht mehr nachgewiesen werden.

## 6. Ausblick

In weiterführenden Versuchen sollte untersucht werden, ob auch andere Proteine der Tight Junctions an den Veränderungen des parazellulären Transportweges beteiligt sind, und ob etwaige Wechselwirkungen zwischen den Proteinen vorliegen. Desweiteren sollte auch untersucht werden, ob sich unter hypoxischen Bedingungen Veränderungen an den Proteinen der Gap Junctions und Adherens Junctions ergeben, und ob diese Veränderungen ebenfalls durch VEGF hervorgerufen werden. Da VEGF eine Hauptrolle bei den Hypoxie-bedingten Veränderungen zu spielen scheint, wäre es sinnvoll nach Methoden zu suchen, die die VEGF-Konzentration unter hypoxischen Bedingungen möglichst niedrig halten. Diese könnten in Form von Bluthirnschranken-gängigen Antikörpern gegen VEGF, durch Blockade der VEGF-Rezeptoren oder durch Hemmung sekundärer durch VEGF angeschalteter Reaktionswege erfolgen. Klinische Bedeutung könnten diese Erkenntnisse bei der Bekämpfung vasogen bedingter Ödembildung unter hypoxischen Bedingungen (z. B. Höhenkrankheit, zerebraler Insult, etc.) gewinnen.



## 7. Literaturverzeichnis

1. Goldstein GW, Betz AL. Die Blut-Hirn-Schranke. *Spektrum der Wissenschaft*. 1986;83-91.
2. Antonelli A, Saunders K, Smith S, et al. An activated form of transforming growth factor  $\beta$  is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989;86:4544-8.
3. Sage MR, Wilson AJ. The Blood-Brain Barrier: An important concept in Neuroimaging. *American Journal of Neuroradiology*. 1994;15:601-622.
4. Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 1986.
5. Audus KL, Bartel RL, Hidalgo IJ, et al. The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharm Res*. 1990;7:435-451.
6. Gumbiner BM. Breaking through the tight junction barrier. *Journal of Cell Biology*. 1993;123:1631-1633.
7. Nagy Z, Peters H, Hüttner I. Fracture faces of cell junctions in cerebral endothelium during normal and hyperosmolar conditions. *Lab Invest*. 1984;50:313-322.
8. Anderson JM, van Itallie CM. Tight Junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am. J. Physiol*. 1995;269:467-475.
9. Willott E, Balda M, Heintzelman M, et al. Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. *American Journal of Physiology*. 1992;262:1119-24.
10. Watson P, Anderson J, VanItallie C, et al. The tight-junction-specific protein ZO-1 is a component of human and rat blood-brain barriers. *Neuroscience Letters*. 1991;129:6-10.
11. Krause D, Mischeck U, Galla HJ, et al. Correlation of Zonula Occludens ZO-1 antigen expression and transendothelial resistance in porcine and rat cultured cerebral endothelial cells. *Neuroscience Letters*. 1991;128:301-304.
12. Gardner T. Histamine, ZO-1 and increased blood-retinal barrier permeability in diabetic retinopathy. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 1995;93:583-621.

13. Lum H, Malik A. Regulation of vascular endothelial barrier function (Review). *American Journal of Physiology*. 1994;267:L223-241.
14. Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, et al. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *Journal of Cell Biology*. 1997;138:181-92.
15. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, et al. Vascular endothelial growth-factor induces ve-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial-cells. *Journal of Cell Science*. 1998;111:1853-1865.
16. Breviario F, Caveda L, Corada M, et al. Functional properties of human VE-cadherin: an endothelial specific cadherin. *Ather. Thromb. (in press)*. 1995.
17. Navarro P, Caveda L, Breviario F, et al. Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270:30965-72.
18. Vittet D, Prandini MH, Berthier R, et al. Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood*. 1996;88:3424-3431.
19. Crone C, Olesen SP. Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res*. 1982;241:49-55.
20. Erben M, Decker S, Franke H, et al. Electrical resistance of measurements of cerebral capillary endothelial cells - a new technique to study small surface areas. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 1995;30:227-238.
21. Furie MB, Cramer EB, Naprstek BL, et al. Migration of neutrophil across monolayer of cultured endothelial cells: an in vitro model of leucocyte extravasation. *J. Cell Biol*. 1984;98:1033-1041.
22. Hart MN, VanDyk LF, Moore SA, et al. Differential opening of the brain endothelial barrier following neutralization of the endothelial luminal charge in vitro. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 1987;46:141-153.
23. Rubin LL, Hall DE, Porter S, et al. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell. Biol*. 1991;115:1725-1735.
24. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulators. *Science*. 1991;251:1451-1455.
25. Caveda L, Corada M, Martin-Padura I, et al. Structural characteristics and functional role of endothelial cell to cell junctions. *Endothelium*. 1994;2:1-10.



26. Pardridge WM. Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier. *Physiological Reviews*. 1983;63:1481-1535.
27. Betz AL, Firth JA, Goldstein GW. Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and anti-luminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Research*. 1980;192:17-28.
28. Tsuji A, Tamai I, Sakata A, et al. Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein. *Biochemical Pharmacology*. 1993;46:1096-1099.
29. Zinke H, Möckel B, Frey A, et al. Blood-brain barrier: a molecular approach to its structural and functional characterization. *Progress in Brain Research*. 1992;91:103-116.
30. Betz AL, Goldstein GW. Brain capillaries: Structure and function. *Handbook of Neurochemistry*. 1984;7:465-484, Plenum New York.
31. Joo F. The blood-brain barrier in vitro: Ten years of research on microvessels isolated from the brain. *Neurochem. Int*. 1985;7:1-25.
32. Audus KL, Borchardt RT. Transport of macromolecules across the capillary endothelium. *Handbook of Experimental Pharmacology, Springer Verlag, New York*. 1991.
33. Audus KL, Borchardt RT. Characterization of an in vitro blood-brain barrier model system for studying drug transport and metabolism. *Pharm.Res*. 1986a;3:81-87.
34. Baranczyk-Kuzma A, Audus K, Borchardt RT. Catecholamine-metabolizing enzymes of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *J. Neurochem*. 1986;46:1956-1960.
35. Scriba GKE, Borchardt RT. Metabolism of catecholamine esters by cultured bovine brain microvessel endothelial cells. *J.Neurochem*. 1989a;53:610-615.
36. Williams SK, Gillis JF, Matthews MA, et al. Isolation and characterization of brain endothelial cells: Morphology and enzyme activity. *J. Neurochem*. 1980;35:374-381.
37. White FP, Dutton GR, Norenberg MD. Microvessel isolated from rat brain: Localization of astrocyte process by immunohistochemical techniques. *J. Neurochem*. 1981;36:328-332.

38. Lasbennes F, Gayet J. Capacity for energy metabolism in microvessels isolated from rat brain. *Neurochem. Res.* 1984;9:1-10.
39. Pardridge WM. New directions in blood-brain barrier research. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1988;529:50-60.
40. Takakura Y, Audus KL, Borchardt RT. Blood-brain barrier: Transport Studies in isolated brain capillaries and in cultured brain endothelial cells. *Advances in Pharmacology.* 1991;22:137-165.
41. Bowman PD, Ennis SR, Rarey KE, et al. Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann. Neurol.* 1983;14:396-402.
42. Tao-Cheng JH, Nagy Z, Brightman MW. Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J. Neurosci.* 1987;7:3293-3299.
43. Kimelberg HK, Norenberg MD. Astrocytes (Review). *Scientific American.* 1989;260:66-76.
44. Davson H. History of the blood-brain barrier concept. *Implications of the blood-brain barrier and its manipulation, Plenum, New York.* 1989;1:27-52.
45. Arthur FE, Shivers RR, Bowman PD. Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Dev. Brain Res.* 1987;36:155-159.
46. Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature.* 1987;325:253-257.
47. Raub TJ, Kuentzel SL, Sawada GA. Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: Barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. *Exp. Cell. Res.* 1992;199:330-340.
48. Detmar M, Brown LF, Berse B, et al. Hypoxia regulates the expression of Vascular Permeability Factor/ Vascular Endothelial Growth Factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *Journal of Investigative Dermatology.* 1997;108:263-268.
49. Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Induction of hypoxia-inducible factor-I, erythropoietin, vascular endothelial growth-factor, and glucose transporter-1 by hypoxia - evidence against a regulatory role for src kinase. *Blood.* 1997;89:503-509.

50. Ijichi A, Sakuma S, Tofilon PJ. Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Normal Rat Astrocyte Cultures. *Glia*. 1995;14:87-93.
51. Sandner P, Wolf K, Bergmaier U, et al. Induction of VEGF and VEGF receptor gene-expression by hypoxia - divergent regulation in-vivo and in-vitro. *Kidney International*. 1997;51:448-453.
52. Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992;359:843-845.
53. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel Heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1989;161:851-858.
54. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, et al. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving  $\alpha v \beta 3$  integrin, osteopontin, and thrombin. *Am. J. Pathol*. 1996;149:293-305.
55. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J.Clin. Invest*. 1989;84:1470-1478.
56. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular Endothelial Growth Factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246:1306-1309.
57. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis. *American Journal of Pathology*. 1995;146:1029-1039.
58. Roberts G, Palade G. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J.Cell Sci*. 1995;108:2369-2379.
59. Senger DR, Peruzzi CA, Feder J, et al. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res*. 1986;46:5629-5632.
60. Wu HM, Huang QB, Yuan Y, et al. VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1996;40:H2735-2739.

61. Yeo T-K, Senger DR, Dvorak HF, et al. Glycosylation is essential for efficient secretion but not for permeability-enhancing activity of vascular permeability factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;179:1568-1575.
62. Plate KH, Breier G, Weich HA, et al. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas. *Nature.* 1992;359:845-848.
63. Berse B, Brown LF, Van de Water L, et al. Vascular Permeability Factor (Vascular Endothelial Growth Factor) Gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol. Biol. Cell.* 1992;3:211-220.
64. Senger DR, Dvorak AM, Peruzzi CA, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983;219:983-985.
65. Criscuolo GR. The genesis of peritumoral vasogenic brain edema and tumor cysts: a hypothetical role for tumor-derived vascular permeability factor. *Yale Journal of Biology and Medicine.* 1993;66:277-314.
66. Hippenstiel S, Krull M, Ikemann A, et al. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial-cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 1998;18:L 678-684.
67. Collins PD, Connolly DT, Williams TJ. Characterization of the increase in vascular permeability induced by vascular permeability factor in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 1993;109:195-199.
68. Roberts WG, Palade GE. Neovasculature induced by vascular endothelial growth-factor is fenestrated *Cancer Research* 1997;57:765-772.
69. Kevil CG, Payne DK, Mire E, et al. Vascular-permeability factor/vascular endothelial-cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:15099-15103.
70. Kubes P. Nitric oxide affects microvascular permeability in the intact and inflamed vasculature. *Microcirculation.* 1995;2:235-244.
71. Kharitonov VG, Sundquist AR, Sharma VS. Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution. *J. Biol. Chem.* 1994;269:5881-5883.
72. Rubbo H, Radi R, Rrujillo M, et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation: Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.* 1994;269:26066-26075.

73. Fallier-Becker P, Rupp J, Fingerle J, et al. Smooth muscle cells from rabbit aorta. In: Piper HM, ed. *Cell culture techniques in heart and vessel research*: Springer-Verlag; 1990:247-270.
74. Abbott N, Couraud P. Studies on an immortalized cell line... in: Greenwood, J., Begley, DJ: *New Concepts of a Blood-brain Barrier*, Plenum Press, New York. 1995:239-249.
75. Roux F, Durieu-Trautmann O, Chaverot N, et al. Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 1994;159:101-13.
76. el Hafny B, Bourre JM, Roux F. Synergistic stimulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities by retinoic acid and astroglial factors in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology.* 1996;167:451-60.
77. Nobles M, Revest PA, Couraud PO, et al. Characteristics of nucleotide receptors that cause elevation of cytoplasmic calcium in immortalized rat brain endothelial cells (RBE4) and in primary cultures. *British Journal of Pharmacology.* 1996;115:1245-52.
78. Durieu-Traumann O, Federici C, Creminon C, et al. Nitric oxide and endothelin secretion by brain microvessel endothelial cells: regulation by cyclic nucleotides. *J. Cell. Physiol.* 1993;155:104-111.
79. Knowles MA, Franks LM. Ultrastructure and biological markers of neoplastic change in adult mouse epithelial cells transformed in vitro. *British Journal of Cancer.* 1978;37:603-11.
80. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.* 1983;65:55-63.
81. Kuhne W, Besselmann M, Noll T, et al. Disintegration of cytoskeletal structure of actin filaments in energy-depleted endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1993;264:H1599-H1608.
82. Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, et al. Isolation and identification of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated low density lipoprotein. *J. Cell. Biol.* 1984;99:2034-2040.

83. Shearman LP, Weaver DR. [i-125] 4-aminobenzyl-5'-n-methylcarboxamidoadenosine ([i-125]ab-meca) labels multiple adenosine receptor subtypes in rat-brain *Brain Research* 1997;745:10-20.
84. Schnitzer J, Allard J, Oh P. NEM inhibits transcytosis, endocytosis, and capillary permeability: implication of caveolae fusion in endothelia. *Am. J. Physiology*. 1995;268:48-55.
85. Schnitzer J, Oh P. Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. *J. Biol. Chem.* 1994;269:6072-6082.
86. Rothman J, Orci L. Movement of proteins through the Golgi stack: a molecular dissection of vesicular transport. *FASEB Journal*. 1990;4:1460-8.
87. Morgan E.H., Baker E. The effect of metabolic inhibitors on transferrin and iron uptake and transferrin release from reticulocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1969;184:442-54.
88. Sztul E, Colombo M, Stahl P, et al. Control of protein traffic between distinct plasma membrane domains. Requirement for a novel 108.000 protein in the fusion of transcytotic vesicles with the apical plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 1993;268:1876-1885.
89. Beckers C, Plutner H, Davidson H, et al. Sequential intermediates in the transport of protein between the endoplasmic reticulum and the Golgi. *J. Biol. Chem.* 1990;265:18298-18310.
90. Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, et al. Filipin-sensitive Caveolae-mediated Transport in Endothelium: Reduced Transcytosis, Scavenger Endocytosis, and Capillary Permeability of Select Macromolecules. *J. of Cell Biology*. 1994;127:1217-1232.
91. Wong M, Gotlieb A. Endothelial cell monolayer integrity. I. Characterization of dense peripheral band of microfilaments. *Arteriosclerosis*. 1986;6:212-219.
92. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, et al. Identification of ZO-1: A high molecular weight polypeptide associated with the tightjunction (zonula occludens) in a variety of cell types. *J. Cell Biol.* 1986;103:755-766.
93. Fischer S, Clauss M, Wiesnet M, et al. Hypoxia induces permeability in brain microvessel endothelial cells via VEGF and NO. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1999;45:C812-C820.

94. Fallon MB, Brecher A, Balda MS, et al. Altered hepatic localization and expression of the tight junction proteins occludin and ZO-1 after common bile duct ligation in the rat. *Am.J.Physiol.* 1995;269:C1057-C1062.
95. Romer L, McLean N, Turner CE, et al. Tyrosine kinase activity, cytoskeletal organization and motility in human vascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 1994;5:349-361.
96. Volberg T, Zick Y, Dror R, et al. The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation on the assembly of adherens type junctions. *EMBO J.* 1992;11:1733-1742.
97. Cecchelli R, Dehouck B, Descamps L, et al. In vitro model for evaluating drug transport across the blood brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1999;36:165-178.
98. Claude P. Morphological factors influencing transepithelial permeability: A model for the resistance of the zonulae occludens. *J. Membr. Biol.* 1989;39:219-232.
99. Baethmann A. Pathophysiological and pathochemical aspects of cerebral edema. *Neurosurg. Rev.* 1978;1:85-100.
100. Fischer S, Renz D, Schaper W, et al. Effects of barbiturates on the expression of vascular endothelial growth factor in hypoxic cultures of porcine brain derived microvascular endothelial cells. *European Journal of Cell Biology.* 1996;69:259 (abstr.).
101. Milton SG, Knutson VP. Comparison of the Function of the Tight Junctions of Endothelial Cells and Epithelial Cells in Regulating the Movement of Electrolytes and Macromolecules across the cell monolayer. *J. Cell. Physiol.* 1990;144:498-504.
102. Milici A, Watrous N, Stukenbrok H, et al. Transcytosis of albumin in capillary endothelium. *J.Cell Biol.* 1987;105:2603-12.
103. Audus KL, Borchardt RT. Characterization of an in vitro blood-brain barrier model system for studying drug transport and metabolism. *Pharmac. Res.* 1986;3:81-87.
104. Ricken A, Rahner C, Landmann L, et al. Bovine endothelial-like cells increase intercellular junctions under treatment with interferon  $\gamma$ . An in vitro study. *Ann. Anat.* 1996;178:321-330.

105. Blum MS, Toninelli E, Anderson JM, et al. Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1997;42:H 286-294.
106. Watanabe H, Kuhne W, Spahr R, et al. Macromolecule permeability of coronary and aortic endothelial monolayers under energy depletion. *American Journal of Physiology*. 1991;260:H1344-52.
107. Moncada S, Palmer RMJ, higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharm. Rev.* 1991;43:109-142.
108. Mayhan W. Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine 5'-diphosphate and bradykinin. *Inflammation*. 1992;16:295-305.
109. Kubes P. Nitric Oxide-induced microvascular permeability alterations: a regulatory role for cGMP. *Am. J. Physiology*. 1993;265:H1909-15.
110. Knowles G, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS*. 1992;17:399-402.
111. Yuan Y, Granger HJ, Zawieja DC, et al. Histamine increases vascular permeability via a phospholipase C-NO synthase-guanylate cyclase cascade. *Am. J. Physiol.* 1993;264:H1734-H1739.
112. Joo F, Temesvai P, Dux E. Regulation of the macromolecular transport in the brain microvessels: The role of cyclic GMP. *Brain Re.* 1983;278:165-174.
113. Klug D, Rabani J, Fridovich I. A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.* 1972;247:4839-4842.
114. Morbidelli H, Chang C-H, Douglas J, et al. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am. J. Physiol.* 1996;270:H411-H415.
115. Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, et al. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1 - A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:23463-23467.



116. Youakim A, Ahdieh M. Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *American Journal of Physiology*. 1999;276:G1279-88.
117. Cohen AW, Carbajal JM, Schaeffer RC. VEGF stimulates tyrosine phosphorylation of beta-catenin and small-pore endothelial barrier dysfunction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory*. 1999;277:H2038-H2049.
118. Goldstein GW. Endothelial cell-astrocyte interactions: A cellular model of the blood-brain barrier. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1988;529:31-39.
119. Risau W, Wolberg H. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurol. Sci.* 1990;5:174-178.
120. Brightman MW, Tao-Cheng JH. Tight junctions of brain endothelium and epithelium. In: Pardridge WM, ed. *The Blood-Brain Barrier*. New York: Raven; 1993:107-124.
121. Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, et al. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells: Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J. Cell. Sci.* 1994;107:1347-1357.
122. Bauer HC, Tonsch U, Amberger A, et al. Gamma-glutamyl-transpeptidase (GGTP) and Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activities in different subpopulations of clones cerebral endothelial cells: response to glial stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990;168:358-363.
123. Meyer J, Raub J, Galla H-J. the susceptibility of cerebral endothelial cells to astroglial induction of blood-brain barrier enzymes depends on their proliferative state. *J. Neurochem.* 1991;57:1971-1977.
124. Maxwell K, Berliner JA, Cancilla PA. Stimulation of glucose analogue uptake by cerebral microvessel endothelial cells by a product released by astrocytes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1989;48:69-80.
125. Kondo T, Kinouchi H, Kawase M, et al. Astroglial cells inhibit the increasing permeability of brain endothelial cell monolayer following hypoxia/reoxygenation. *Neuroscience Letters*. 1996;208:101-104.
126. Fischer S, Renz D, Schaper W, et al. Effects of barbiturates on hypoxic cultures of brain derived microvascular endothelial cells. *Brain Res.* 1996;707:47-53.



## 8. Anhang

### 8.1. Liste der verwendeten Abkürzungen

AJ	Adherens Junction
ANF	Atrial Natriuretic Factor
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BBB	Blood brain barrier
BHS	Bluthirnschranke
BMEC	Brain microvascular endothelial cells
BSA	bovines Serumalbumin
BSMC	glatte Muskelzellen aus der Rinderaorta
BUI	Brain uptake index
C	Celsius
C6	Astrozytomazelllinie
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CSG	Zelllinie aus Carcinomzellen der Submandibulardrüse
dd	doppelt destilliert
DAPI	4,6-diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GJ	Gap Junction
h	Stunde
HRP	horse radish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
LDL	Low density Lipoprotein
M	molar
MA	Milliamper
MAO	Monoaminoxidasen
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MW	Molekulargewicht
N-Cadherin	neural Cadherin
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PKC	Proteinkinase C
PSMF	Phenylmethylsulfonylchlorid
RBE4	immortalisierte Endothelzelllinie aus Rattenhirnendothelzellen

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute/Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	TRIS buffered saline (TRIS gepufferte Salzlösung)
TBST/TRIS	buffered saline+TWEEN (TRIS gepufferte Salzlösung+TWEEN)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$	Tumor Growth Factor- $\beta$
TJ	Tight Junction
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TRIS/HCl	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
VE-Cadherin	Vascular Endothelial Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentralnervensystem
ZO-1	Zonula occludens protein 1
ZO-2	Zonula occludens protein 2

## 8.2. Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Albumin bovine (BSA)	Sigma
Ammonium Persulfate (APS)	Sigma
Amphotericin B	Life Technologies
Anti- $\alpha$ -smooth-muscle-actin	Sigma Immunochemicals
Anti-cow glial fibrillary acidic protein	DAKO
Anti-Human-Von-Willebrand-Factor	Sigma Immunochemicals
Anti-mouse-Phosphotyrosine	Sigma
Anti-mouse-HRP	Santa Cruz Biotechnology
Anti-rabbit-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Rabbit-ZO-1	Zymed
Anti-smooth and skeletal Myosin	Sigma Immunochemicals
Anti-VEGF	Preprotech
Bio-Rad DC Protein Assay	Bio-Rad
Biotin-SP-konjugierter Affinity Pure Donkey Anti-Rabbit-IgG	Jackson Immuno Research
Biotin-conjugated Affinity Purified Anti-Mouse-IgG	Rockland
Cell Titer 96TM Non-Radioactive cell proliferation assay	Promega
Chymostatin	Sigma
Cy2-konjugiertes Streptavidin	Rockland
DAPI	Molecular Probes
Dextran	Sigma
Dispase	Boehringer Mannheim
DMSO	Sigma
Dulbecco's Mod.Eagle Medium	Life Technologies
Dulbecco's Mod.Eagle Medium/Nutmix/F12	Life Technologies
ECL detection reagents	Amersham
EDTA	Sigma
Evans Blue	Sigma
Fetal calf serum	Sigma
G418 Sulfate	Life Technologies
Gentamycin	Life Technologies
L-Glutamine	Life Technologies

Glycine	Sigma
Human FGF	Peprtech
Hybon Tm ECL TM	Amersham
<sup>3</sup> [H]-Inulin	Amersham
Kollagenase/Dispase	Boehringer Mannheim
Lämmli Sample Buffer	Bio-Rad
Dil-Ac-LDL	Paesel&Lorei
$\alpha$ -Liponsäure (thioctacid)	Merck
M199-Medium	Life Technologies
M199-Medium (10x)	Life Technologies
2-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Sigma
Mowiol	Hoechst
Normal Goat Serum	Life Technologies
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies
Pepstatin	Sigma
Percoll	Amersham
Phalloidin-TRITC labeled	Sigma
PMSF	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
Propidiumjodid	Rockland
Protein-A-Sepharose	Santa Cruz Biotechnology
RainbowTMcoloured protein molecular weight marker	Amersham
Rat tail collagen	Becton Dickinson
SDS	Sigma
TEMED	Sigma
Triton x-100	Sigma
Trypsin-EDTA-Lösung	Life Technologies
Trypsin-Inhibitor	Sigma
Tween-20	Bio-Rad
VEGF	Preprotech

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, die durch ihre wissenschaftlichen Ratschläge und mit moralischer Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Schaper möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine Betreuung vor Ort danken.

Frau Dr. Silvia Fischer danke ich für die Bereitstellung des Themas und für ihr Bemühen mich darin zu unterstützen. Außerdem danke ich ihr für ihre konstruktive Kritik und schöne gemeinsame Unternehmungen.

Marion möchte ich für ihr Bemühen danken mich in die Laborarbeit einzuweisen und ihre Geduld dabei, und dafür, daß sie immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und meistens Schokolade parat. Danken möchte ich auch Petra für die Entsorgung meines Abfalls, Gerd und Gunther für ihre große Hilfe am Computer, Dimitri für Tips und Tricks am Mikroskop und beim Fotografieren, Annemarie Moebs für die Fotos und Siggi, Christoph und Jan für lustige Augenblicke. Außerdem all jenen, die durch leibliche Genüsse zur Unterstützung meines Wohlbefindens beigetragen haben.

Meinen Eltern und Geschwistern möchte ich für die Unterstützung während des gesamten Studiums und des vergangenen Jahres danken. Ein besonderes Dankeschön gilt Sr. M. Johannis, die wesentlich dazu beigetragen hat, mein naturwissenschaftliches Interesse zu fördern und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Bei Thorsten möchte ich mich für seine Geduld und Unterstützung bedanken.





## 10. Lebenslauf

Name: Maria Anne Wobben  
geboren am: 20.01.1976  
Geburtsort: Thuine  
Eltern: Anni Wobben, geb. Schwennen, Hausfrau  
Dr. Josef Wobben, Veterinär

### Schulbildung

1982-1986	Grundschule Castellschule, Thüringer Str., 49809 Lingen
1986-1988	Orientierungsstufe Lingen-Laxten
1988-1995	Franziskusgymnasium Lingen-Laxten, Erlangung der Hochschulreife
seit Oktober 1995	Studium der Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen z. Zt. 10 Semester, Abschluß des 2.Staatsexamsens voraussichtl. April 2001
seit Juli 1999	Promotionsarbeit am Max-Planck-Institut, Bad Nauheim, Abt. Experimentelle Kardiologie